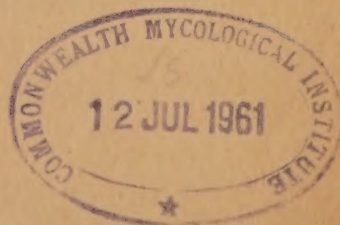
Vol. XXX Nr 2 1961

ACTA SOCIETATIS BOTANICORUM POLONIAE

Organ Polskiego Towarzystwa Botanicznego
Publication de la Société Botanique de Pologne



WARSZAWA 1961



TREŚĆ — SOMMAIRE

Vol. XXX Nr 2

ACTA SOCIETATIS BOTANICORUM POLONIAE

Organ Polskiego Towarzystwa Botanicznego
Publication de la Société Botanique de Pologne

Vol. XXX Nr 2

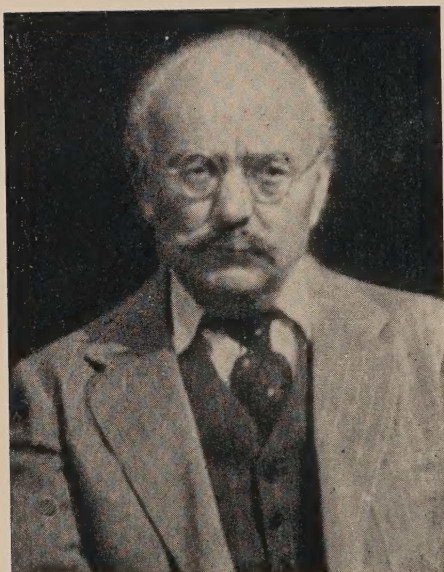


WARSZAWA 1961

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA, MIODOWA 10

Nakład 877+173 egz.	*Oddano do składu 21.II.1961.*
Ark. wyd. 15,5 ark. druk. 12,75+9 wklejek	*Podpisano do druku w maju 1961 r.*
Papier druk. sat. 80 g. kl. V	*Druk ukończono w czerwcu 1961 r.*
Format B5, 70×100 cm	*Zam. 87/61 S-22 Cena zł 35.—*

Warszawska Drukarnia Naukowa, Warszawa, ul. Śniadeckich 8



Profesor dr István Györffy
19.XII.1880 — 16.IV.1959

ACTA SOCIETATIS
BOTANICORUM POLONIAE
Vol. XXX — Nr 2
1961

Profesor Dr István Györffy

(1880 — 1959)

W roku 1959 zmarł profesor dr István Györffy członek Polskiego Towarzystwa Botanicznego autor licznych prac o florze Tatr, znany biolog i florysta, a jednocześnie wielki przyjaciel Polski, często publikujący swe prace w Acta Societatis Botanicorum Poloniae. Dzięki uprzejmości Jego syna, prof. Barna Györffy, publikujemy teraz otrzymany życiorys zmarłego, wybitnego botanika węgierskiego wraz z jego fotografią. Prof. B. Györffy pisze, że w papierach zmarłego ojca znalazł kopertę z fotografią i z napisem: „przesłać po mojej śmierci do Polskiego Towarzystwa Botanicznego". Polskie Towarzystwo Botaniczne spełnia więc jego ostatnie życzenie, żegnając w ten sposób swego czynnego członka i przyjaciela.

ŻYCIORYS PROFESORA DR ISTVÁN GYÖRFFY'EGO

Profesor István Györffy urodził się w Hidasnémeti niedaleko Koszyc 19 grudnia 1880 r. Po ukończeniu szkoły średniej w roku 1899 zapisał się na Uniwersytet w Koloszwarze i następnie rozpoczął w 1901 r. prace w Dziale Botanicznym Siedmiogrodzkiego Muzeum jako demonstrator. W roku 1903 zostaje asystentem w Instytucie Botanicznym Uniwersytetu, którym kierował w owym czasie prof. V. Borbas. Po otrzymaniu doktoratu w 1904 r. zostaje nauczycielem w szkole podstawowej w Makó (1904—1909), a następnie w gimnazjum w Löcse (1909—1914).

Jeszcze jako student interesował się anatomią mchów, a jego nauczycielem wprowadzającym go do briologii był Márton Péterfi. Jego pierwsza notatka briologiczna ukazała się już w 1903 r. Po opuszczeniu Koloszwaru pozostawał nadal w kontakcie z wybitnymi briologami. W roku 1904 po raz pierwszy odwiedził Tatry i od tego czasu prawie co roku spędzał tu swoje wakacje. W roku 1905 ożenił się z Irmą Greisiger z Białej Spiskiej, również botaniczką, specjalistką od rodzaju *Euphrasia*. W roku 1912 habilituje się z botaniki na Uniwersytecie w Koloszwarze i w roku 1914, mając już ponad 125 różnych publikacji, powraca

do uniwersytetu jako profesor botaniki ogólnej i pozostaje na tym stanowisku przez 5 lat. W tym czasie wydaje „Botanikai Muzeumi Füzetek" i „Bryophyta regni Hungariae exiccata" (I—III, 1915—1919). W 1919 r. Uniwersytet w Koloszwar zostaje przeniesiony czasowo do Budapesztu, gdzie w 1920 r. prof. Györffy ponownie się habilituje z briologii. Po przeniesieniu w 1929 r. Uniwersytetu Transylwańskiego do Szegedu, prof. Györffy kieruje Instytutem Botanicznym i Muzeum oraz Ogrodem Botanicznym.

Był on już od szeregu lat członkiem komitetu redakcyjnego „Magyar Botanikai Lapok" i współpracownikiem szeregu europejskich wydawnictw zielnikowych. Współpracował z „Revue Bryologique et Lichénologique" oraz wydawał „Acta Biologica pars Botanica", w 1924 r. utworzył nowe wydawnictwo „Folia Cryptogamica". Był członkiem wielu towarzystw naukowych, ale zawsze na pierwszym miejscu stawiał przynależność swoją do Polskiego Towarzystwa Botanicznego. W roku 1940 został wybrany członkiem korespondentem Węgierskiej Akademii Nauk. W roku 1940 powrócił ze swym Uniwersytetem do Koloszwaru (Cluj) w Siedmiogrodzie, ale po 4 latach w czasie II wojny światowej został ewakuowany i opuścił to miasto po raz drugi na zawsze. Pozostawił tam całą swoją bibliotekę, zbiory i maszynopisy, które odzyskał dopiero po wielu latach. W czasie zawieruchy wojennej przenosił się z miejsca na miejsce i trafił aż do Salzburga. Dopiero w 1946 r. wraca do kraju, do swego syna lekarza w Mátraháza. Do roku 1950, w którym przeszedł na emeryturę, był profesorem przy Wydziale Botanicznym Węgierskiego Muzeum Narodowego. Od roku 1950 mieszkał w Gyula, gdzie po ataku apoplektycznym nie mógł się już więcej poruszać. Zmieniając jeszcze kilka razy miejsce pobytu wreszcie osiadł w 1958 r. w Csákvár. Mimo swego kalectwa zachował całkowite władze umysłowe i do ostatnich swych miesięcy pracował systematycznie przygotowując przede wszystkim swoje podstawowe dzieło „Podręcznik Brioteratologii". Niestety ze względu na nie sprzyjające okoliczności nie doczekał się wydrukowania swego głównego dzieła życia. Zmarł w szpitalu Székesfehérvár 16 kwietnia 1959 r. i został pochowany w Csákvár.

Prof. B. Györffy nadesłał także pełną bibliografię prac prof. I. Györffy obejmującą 718 pozycji, której ze względu na brak miejsca nie możemy opublikować. Została ona przekazana do Biblioteki PTB.

Prof. Dr István Györffy
(1880 — 1959)

Dr István Györffy, emeritus Professor of Botany, was born at Hidasnémeti, near Kassa (Košice) in 19 December 1880. By the time he went to school, he attended the primary schools Felsöméra and Túrkeve, afterwards he was educated at the grammar school in Sárospatak, then in Arad where he took his finals. In 1899 he entered the University of Kolozsvár (Transylvania), where he became associated first with the Botany Department of the Transylvanian Museum Association, then in 1901 demonstrator, and in 1903 assistant in Botany at the Botanical Institute of the University under Professor A. Richter and Vince Borbás, respectively. Immediately following the earning of his Dr. phil. degree in 1904, he joined the teaching staff of the grammar school in Makó for the period 1904—1909, afterwards teaching at the high school Löcse from 1909 to 1914.

Already in his first University student years he began at his own interest to study the anatomy of mosses, and he was introduced to the bryological knowledge by Márton Péterfi; his first bryological note appeared in 1903. However, after leaving Kolozsvár he established contacts with the eminent foreign bryologists E. Stolle, V. F. Brotherus, L. Loeske, W. Mönkemeyer, V. Schiffner. It was in 1904 the first time, that he vesited the High-Tatra, and since that time he spent his vacation almost every year there. He married Irma Greisiger, the daughter of the town physician in Szepesbéla (Spišká Belá) in 1905; she was also educated at the University Kolozsvár, and she acquired also a reputation in Botany, as a specialist of the genus *Euphrasia*. In 1912 Dr. István Györffy received a habilitation in botany, and especially in bryology, from the University of Kolozsvár, and in 1914, when his botanical publications amounted already over 125, he returned to Kolozsvár as Professor of General Botany at the University, where he remained for five years. There he edited the "Botanikai Muzeumi Füzetek" (1915—1919) and the "Bryophyta regni Hungariae exsiccata" (I—III., 1915—1919). In 1919 the University of Kolozsvár was transferred temporarily to Budapest, where in 1920 he received a habilitation in bryology also from the University of Budapest. In 1929 the University of Transylvania was settled in Szeged, where I. Györffy had to establish a new Botanical Institute and Museum and to found also a Botanical Garden.

He was already since long years a member of the editorial board of the "Magyar Botanikai Lapok", and a collaborator of several European Exsiccatae, and also of the Revue Bryologique et Lichénologique. In

Szeged he edited the "Acta Biologica pars Botanica", and in 1924 he founded the "Folia Cryptogamica". He was a member of several scientific societies, however, he ranked always proudly as the first, the Polskie Towarzystwo Botaniczne. In 1940, he was elected for a correspondent member of the Hungarian Academy of Sciences.

In 1940 he returned with his University to the old town, Kolozsvár--Cluj, in Transylvania, however after four years, when the disorder of the Second World War approached Kolozsvár, following the official evacuation at the end of 1944, he had to leave this town already for the second time -and now- for ever; All his collections, library and manuscripts remained there, and years after he could take possession of them again. Since 1944 he underwent together with his family the whirls of the World War; he was pushed to Keszthely (Lake Balaton), then Magyaróvár, and in 1945 up to Salzburg. At the very end of 1946 he could return again to his own country, and he moved to his son physician in Mátraháza. He served still as a professor of the University of Kolozsvár, however, by a special arrangement assigned to the Botany Department of the Hungarian National Museum, till his retirement in 1950. Since 1950 he lived in Gyula, where he was strucken in 1952 by a severe cerebral apoplexy which compelled him to give up every excursions, collectings, and even his daily short walks for ever. He moved to Józsefszanatorium in 1952, than to Budakeszi in 1957, and finally to Csákvár in 1958. Despite of his lameness he continued his job systematically without any failing in his memory quite up to the last month of his life. With toughness he strived to complete his several manuscripts, especially his great Handbook of Bryoteratology, which he always regarded as his own life's work. The misfortune of this has been, that its appearance coincided with adverse times. The fulfilment of his wish to see his last completed manuscripts published was not granted, and was taken out of his hand by death. He died in the Hospital of Székesfehérvár on 16 April 1959, and he was burried in Csákvár.

Barna Györffy

ACTA SOCIETATIS
BOTANICORUM POLONIAE
Vol. XXX — Nr 2
1961

Nowe aspekty roli azotanów względnie soli amonowych jako źródeł azotu dla roślin. Część I

New aspects on the role of nitrates or ammonium salts as nitrogen sources for plants. Part. I.

J. POSKUTA

WSTĘP

Badania nad rolą azotanów, względnie soli amonowych, jako źródeł azotu dla roślin, mają ponad 100-letnią historię. W roku 1855 J. B. Boussingault stwierdził w glebie obecność azotanów i wykazał, że stanowią one doskonałe źródło azotu dla roślin. W. Knop (1860) i J. Sachs (1860) wykazali zdolność pobierania przez rośliny azotu mineralnego z pożywek płynnych. W następstwie, we wszystkich cywilizowanych krajach, wykonano ogromną ilość prac, gdyż ważność problemu, jakim jest zwiększenie produkcji płodów rolnych pod wpływem nawozów sztucznych, a przede wszystkim azotowych, jest oczywista. Wartość azotanów lub soli amonowych jako źródeł azotu dla roślin jest uzależniona od szeregu czynników.

1. Fizjologiczny odczyn azotanów i soli amonowych

Pierwszymi badaczami, którzy zwrócili uwagę na fizjologiczną kwasowość chlorku amonu i siarczanu amonu, byli F. Rautenberg i G. Kühn (1864). D. N. Prianisznikow (1951) opierając się na spostrzeżeniach wymienionych autorów, w wyniku wieloletnich badań (1899—1947) wykazał, że cenność azotanów, względnie soli amonowych jako źródeł azotu dla roślin, zależy w znacznej mierze od ich fizjologicznej reakcji. Następnie pobieranie jonów azotanowych i amonowych było przedmiotem badań M. Górskiego (1929), A. Maksimowa (1929), K. Pirschle (1929), V. A. Tiedjensa i W. R. Robbinsa (1931), J. A. Naftela (1931). Z prac tych wynika, że azotany i sole amonowe stanowią równie dobre źródła azotu przy odpowiednich dla nich wartościach pH, przy czym jony amonowe są intensywniej pobierane

w granicach pH 6,0—7,0, a jony azotanowe przy pH 4,0—5,0. W granicach pH 5,5—6,5 wyniki były zbliżone. P. Strebeyko (1932) stwierdził, że fizjologiczna reakcja azotanu amonu była bardziej zasadowa w wyższej temperaturze, ponieważ jon azotanowy był szybciej pobierany w stosunku do jonu amonowego. L. B. Arrington i J. W. Shive (1935) badali pobieranie azotu w formie amonowej i azotanowej przez 10-dniowe siewki pomidorów i wykazali, że przy pH 4,0 rośliny pobrały przeszło 4-krotnie więcej azotanów niż jonów amonowych, a przy pH 7 tylko o 20% więcej jonów azotanowych niż amonowych. Dane te zgadzają się z wcześniejszymi wynikami H. E. Clarka i J. W. Shive (1934). S. F. Trelease i H. M. Trelease (1933) uważają, że w fizjologicznie zrównoważonych roztworach jony amonowe i azotanowe są w przybliżeniu pobierane w jednakowych ilościach.

2. Jonowa równowaga i skład pożywki

Z danych doświadczalnych D. N. Prianisznikowa wynika, że zwiększenie zawartości jonu Ca sprzyja pochłanianiu jonu amonowego. Z drugiej strony wyjaśniono, że pobieranie azotanów jest intensywniejsze w obecności szybko pobieranych kationów, np. K (A. G. McCalla i E. K. Woodford 1948, G. T. Nightingale 1942, D. A. Arnon 1939). Stwierdzono także, że pobieranie azotanów jest uzależnione od poziomu fosforu (G. T. Nightingale 1942). C. P. Sideris i H. Y. Young (1946) wykazali, że wysoka zawartość fosforu w pożywce wobec niskiej zawartości azotanów spowodowała silną obniżkę plonu ananasów. D. R. Hoagland i D. J. Arnon (1941) stwierdzili, że wysoka zawartość chloru w pożywce hamuje pobieranie azotanów. Z badań B. Niklewskiego i J. Wojciechowskiego (1938) wynika, że dodatni wpływ na pobieranie jonów amonowych wywiera próchnica. Wpływ tego czynnika na pobieranie jonów SO_4 i HPO_4 okazał się mniejszy.

3. Zawartość węglowodanów w roślinie

Badania O. Warburga i E. Negeleina (1920), D. N. Prianiszkowa (1951), A. C. Chibnella (1939), G. T. Nightingale i L. G. Schemerhorna (1928), L. H. J. Bongersa (1956) wykazały ścisłą zależność metabolizmu azotowego z zawartością węglowodanów w roślinach. W warunkach niedostatecznego zaopatrzenia w węglowodany w komórkach roślinnych może nagromadzić się znaczna ilość amoniaku, azotynów i azotanów, które mogą być toksyczne dla roślin.

4. Stadium rozwojowe roślin

Pobieranie jonów amonowych i azotanowych w zależności od stadium rozwojowego roślin nie jest dotąd wyjaśnione. D. N. Prianisznikow (1935) polemizuje z wynikami prac J. A. Naftela (1931) oraz A. L. Stahla i J. W. Shive (1933), którzy stwierdzili, że młode rośliny intensywniej pobierają jony amonowe, natomiast w późniejszym okresie jony azotanowe. D. N. Prianisznikow uważa, że można to wyjaśnić poziomem soli w pożywce, a przede wszystkim soli azotowych. Zmniejszona ilość jonów Ca oraz wysoki poziom jonów SO_4 w pożywce stanowiły przyczynę tego stanu rzeczy.

5. Możliwość kompensacji niedoboru tlenu przez azotany

Zagadnienie to było przedmiotem obszernych badań D. J. Arnona (1937), który wykazał, że azotany mają zdolność kompensacji niedoboru tlenu w pożywce. Potwierdzono tym samym wcześniejsze wyniki J. W. Shive (1934). A. R. C. Haas (1940) stwierdził, że drzewa pomarańczowe, rosnące na stale nawadnianym czarnoziemie, zginęły po 16 miesiącach, kiedy były nawożone dużymi dawkami azotu w formie $(NH_4)_2SO_4$, natomiast drzewa rosnące w podobnych warunkach, lecz nawożone azotem w formie $Ca(No_3)_2$ nie zginęły i wykazały wzrost. W. H. Patrick, J. R. i M. B. Sturgis (1955) badali pobieranie jonów amonowych i azotanowych przez ryż w zależności od aeracji podłoża. Autorzy ci nie zdołali wykazać wyższości azotanów nad solami amonowymi. Jednakże jeżeli uwzględnimy wyniki obszernej pracy D. L. Taylora (1942), który stwierdził, że ryż w porównaniu z innymi zbożami ma wysoce aktywny mechanizm oddychania śróddrobinowego, a słabszy mechanizm oddychania tlenowego, to wyniki wymienionych autorów bynajmniej nie przeczą możliwości kompensacji niedoboru tlenu przez azotany. Zagadnienie to oraz rolę mikroelementów szerzej omawiamy w dyskusji I części pracy.

Opisana niżej praca została podjęta z inicjatywy i wykonana pod kierunkiem prof. dra K. Bassalika.

BADANIA WŁASNE

Wpływ aeracji, źródła azotu i manganu na wzrost kukurydzy i jej potencjał oksydoredukcyjny

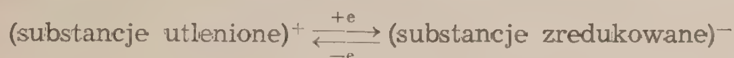
DOŚWIADCZENIE I

Rolnikom praktykom dawno znany jest zabieg „okopywania" roślin, który znacznie zwiększa plony, jednakże w literaturze zupełnie nie ma prac, które by wyjaśniały celowość tego zabiegu. Zwyżka plonów często

objaśniana jest zwiększeniem wymiany gazowej między atmosferą gleby i atmosferą powietrza, jednakże brak jest dotychczas danych o optymalnych warunkach powietrznych dla korzeni roślin, o wpływie aeracji na procesy zachodzące w roślinach, o współdziałaniu szeregu innych czynników mających wpływ na rośliny. Na możliwość tego rodzaju wpływu wskazują dane z pracy D. J. Arnona (1937). Autor przeprowadzał doświadczenia z jęczmieniem w kulturach wodnych przy stałym i kontrolowanym pH 6,0 i stwierdził, że jęczmień inaczej reagował na aerację pożywki, w której azot znajdował się w formie amonowej, niż kiedy podany był w formie azotanowej. Mianowicie rośliny rosnące na pożywce amonowej silnie reagowały na wietrzenie pożywki, słabo natomiast reagowały na ten zabieg rośliny, które otrzymały azot w formie azotanowej. Autor stwierdził także, iż dodanie do pożywki manganu silnie wpływało na wzrost roślin rosnących na pożywkach amonowych nie przewietrzanych oraz nie wpływało wcale na rośliny przewietrzane oraz nie przewietrzane na pożywce azotanowej, hodowane wiosną. Zauważono jednak dodatni wpływ manganu na rośliny hodowane jesienią na pożywce azotanowej nie przewietrzanej.

Podobne działanie autor stwierdził po dodaniu do pożywki miedzi. Wyniki te D.J. Arnon objaśnia tym, że anion NO_3 jest dla rośliny nie tylko źródłem azotu, ale i tlenu, a działanie manganu i miedzi tym, że te pierwiastki biorą udział w procesach oksydoredukcyjnych zwiększając intensywność tych procesów. Nieco późniejsze badania H. Lundengardha (1939) wykazały, że mangan wywiera duży wpływ na oddychanie roślin. Mianowicie dodanie 0,00005 mol $MnCl_2$ na litr pożywki spowodowało zwiększenie intensywności pochłaniania tlenu o 155—470%, w przeciwieństwie do żelaza, które w formie chlorku żelaza i cytrynianu żelaza w analogicznych stężeniach powodowało zmniejszenie pobierania tlenu o ok. 21%. Prowadzone w tymże czasie badania H. Burströma (1939) wyjaśniły, że mangan silnie wpływa na asymilację azotanów przez korzenie pszenicy, natomiast żelazo tego rodzaju wpływu nie wykazało. Autor konkluduje, że bezpośrednim katalizatorem w procesie pochłaniania azotanów jest mangan, a nie żelazo. C. Eyster, T. E. Brown, H. E. Tanner i S. L. Hood (1958) stwierdzili, że mangan bierze udział w procesie fotosyntezy i w reakcji Hilla oraz niezbędny jest dla wzrostu *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus quadricauda*, *Nostoc muscorum*, *Porphyridium cruentum* i *Lemna minor*. Z badań E. A. Bojczenko i N. I. Zacharowej wynika, że w czasie fotosyntezy w liściach *Primula obconica* i *Trifolium repens* zwiększa się ilość żelaza w formie zredukowanej, ulega również zwiększeniu ilość manganu w formie utlenionej.

Założeniem pracy było, że azotanowa forma azotu, dodanie do pożywki manganu oraz aeracja pożywki okażą wpływ na wzrost roślin poprzez zmianę procesów oksydoredukcyjnych, zachodzących w roślinie pod wpływem tych czynników. Mechanizm reakcji utleniania i redukcji jest rezultatem oddania lub przyłączenia elektronów, przeto reakcje utleniania i redukcji możemy przedstawić w postaci następującego schematu:



wg D. A. Sabinina (1955),

a stosunek substancji utlenionych do zredukowanych w formie potencjału oksydoredukcyjnego wg wzoru: $E_h = 0{,}029\ (rH - 2pH)$ lub

$$rH = \frac{E_h}{0{,}029} + 2pH \text{ przy } 18^\circ C$$

Celem pracy było wyjaśnienie, w jakim stopniu aeracja pożywki, źródło azotu i dodatek do pożywki manganu okażą wpływ na:

1) wzrost kukurydzy,
2) potencjał oksydoredukcyjny pożywki w okresie wegetacji,
3) potencjał oksydoredukcyjny wewnątrz rośliny,
4) zawartość cukrów rozpuszczalnych i wolnych kwasów organicznych w roślinie oraz,
5) w jakim stopniu możliwa jest kompensacja niedoboru tlenu przez azotany.

Metodyka badań

Skład i regulacja pH pożywki. W przeprowadzonych badaniach roślin zostały użyte analogiczne pożywki jak w doświadczeniu D. J. Arnona (1937). Skład pożywki zakłada równe ilości wszystkich pierwiastków tak w pożywce amonowej jak i azotanowej. Wyjątek stanowi siarka, której jest o 123,8 mg/l więcej w pożywce amonowej niż azotanowej oraz tlen, którego w solach pożywki amonowej jest o 64 mg/l więcej niż w pożywce azotanowej. W tabeli 1 podany jest skład pożywek. Jedyna zmiana w wymienionych pożywkach polegała na tym, że zamiast winianu żelaza dodawano cytrynian żelaza. Utrzymywanie pH pożywek na stałym poziomie należało do najważniejszych czynności w okresie wegetacji roślin. Żelazo dodano w ogólnej ilości 4,6 mg/l dawkując co drugi dzień po 10 ml odpowiednio rozcieńczonego roztworu cytrynianu żelaza. pH pożywek ustalono na 6,7 i utrzymywano na stałym poziomie w okresie wegetacji przez dodawanie 1n H_2SO_4 i 1n NaOH. Oznaczenia pH wykonywano przy pomocy pehametru lampowego. Do badań użyto dużych

4,5-litrowych słojów szklanych pomalowanych z zewnątrz czarną olejną farbą i dwukrotnie białą. W ten sposób wyeliminowano znaczniejsze nagrzewanie się pożywek w wazonach, a system korzeniowy roślin znajdował się w ciemnym wnętrzu wazonu. Rozmiary wazonów, a tym samym pożywki, mają duże znaczenie w utrzymywaniu pH pożywki na stałym poziomie w okresie wegetacji roślin, gdyż duże ilości roztworu zapobiegają znaczniejszym zmianom odczynu środowiska w krótkim czasie. Wagę tego czynnika podkreśla D. J. Arnon i współpracownicy (1942).

Tabela 1 — Table 1

Pożywki
Culture solutions

Sól Salt	Roztwór NH_4 NH_4 solution	Zawiera mg/l Content mg/l	Roztwór NO_3 NO_3 solution	Zawiera mg/l Content mg/l
$MgSO_4$	0,003 M	Mg— 72,9	0,003 M	Mg— 72,9
K_2SO_4	0,0015 M	K—117,3	0,001 M	K—117,3
$Ca(H_2PO_4)_2$	0,002 M	P—123,9	0,0015 M	P—123,9
KH_2PO_4	———	Ca—140,2	0,001 M	Ca—140,2
$CaSO_4$	0,0015 M	S—256,5	———	S—128,2
$(NH_4)_2SO_4$	0,002 M	N— 56,0	———	N— 56,0
$Ca(NO_3)_2$	———	O—768,0	0,002 M	O—704,0

A e r a c j a p o ż y w k i. W licznych badaniach wpływu aeracji na wzrost roślin stosowano różne metody wietrzenia podłoża w zależności od celów stawianych przez badaczy i możliwości technicznych. W naszych badaniach zastosowano aparaty do przewietrzania szeroko używane w akwariach. Po odpowiedniej regulacji tych aparatów osiąga się możliwie jednakowe ilości wtłaczanego powietrza do wazonu, a dzięki połączeniu żądanej ilości aparatów przy pomocy łączników ze źródłem prądu wszystkie wazony są jednocześnie przewietrzane równym strumieniem powietrza. Pożywki przewietrzano w ciągu 10 godzin na dobę od 9^{00} rano do 19^{00} wieczorem. Do pożywki w każdym wazonie wtłaczano około 15 l powietrza na godzinę.

O z n a c z a n i e p o t e n c j a ł u o k s y d o r e d u k c y j n e g o i z a w a r t o ś c i t l e n u w p o ż y w c e. Potencjał oksydoredukcyjny oznaczano wg metody opisanej przez W. L. Omelianskiego (1940) i stosowanej w badaniach mikrobiologicznych. Zdając sobie sprawę ze zmienności tego czynnika, aby otrzymać porównywalne wyniki, do pożywek zanurzano elektrody platynowe na jednakową głębokość 10 cm i po upływie 2 minut odczytywano potencjał oksydoredukcyjny. Elektrody miały kształt prostokątów o rozmiarach 0,5 × 1,0 cm. Do oznaczeń E_h wewnątrz łodygi użyto elektrod platynowych w kształcie igły o długości

0.5 cm. Pomiary wykonywano przy pomocy potencjometru P-4. Zawartość tlenu w pożywce oznaczano wg Winklera w modyfikacji Rideal-Stewarda. Doświadczenie przeprowadzono wg schematu:

Przewietrzane: NH_4
NO_3
NH_4+Mn
NO_3+Mn
Nie przewietrzane: idem

Mangan dodano w ilości 0,5 mg/l w formie $MnSO_4 \cdot 4H_2O$. Obecności azotanów w czasie wegetacji w pożywce amonowej nie stwierdzono (próby z dwufenyloaminą w stężonym kwasie siarkowym). Powtórzenia 4-krotne.

Przebieg wegetacji

28.IV.1958 r. wybrano nasiona kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays* L.) i kiełkowano na wodzie destylowanej. 3.V wykiełkowane siewki przeniesiono na wymienione pożywki i hodowano w piwnicy na oknie dobrze naświetlonym. Już 15.V zaobserwowano różnice we wzroście na korzyść roślin rosnących na pożywkach azotanowych. Zwłaszcza system korzeniowy tych roślin był silniej rozwinięty i rozgałęziony. 20.V wybrano jednakowe rośliny i przeniesiono na pożywki do 4,5-litrowych słojów, po 1 roślinie w każdym słoju. Tegoż dnia zaczęto przewietrzanie. Po 10 dniach od chwili, kiedy zaczęto przewietrzanie, obserwowano już znaczne różnice we wzroście roślin rosnących na pożywkach przewietrzanych, przy czym największy dodatni wpływ aeracji przejawił się na pożywce amonowej. 27.VI oznaczono E_h w łodydze u nasady 1 i 2 międzywęźli. 28.VI rośliny sfotografowano oraz oddzielono korzenie od części nadziemnej. Materiał roślinny zabijano w temperaturze 90°C, po czym suszono w ciągu 30 godzin w temperaturze 70°C w suszarce elektrycznej.

Omówienie wyników

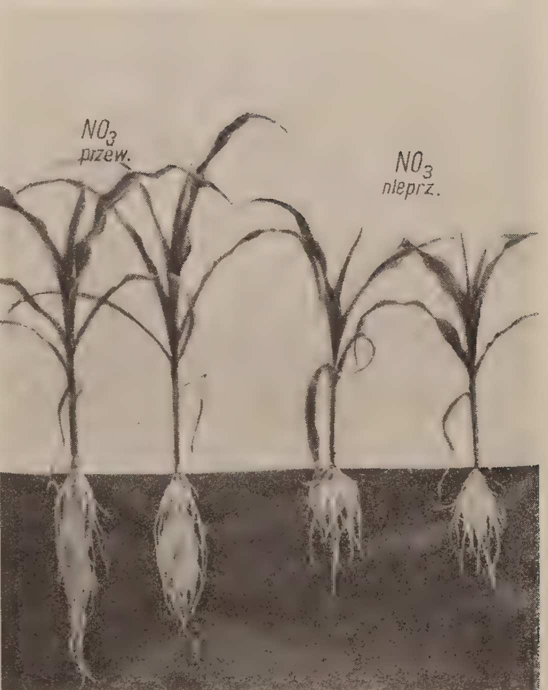
W tabeli 2 zestawiono wyniki doświadczenia w odniesieniu do suchej masy roślin.

W p ł y w a e r a c j i n a w z r o s t k u k u r y d z y. Największy wpływ aeracji na wzrost roślin przejawił się na pożywkach amonowych. Różnica w suchej masie części nadziemnej, na pożywce amonowej nie przewietrzanej przyjętej za 100%, wyraża się cyfrą 100 do 225% dla roślin rosnących na pożywce amonowej przewietrzanej. Podobnie sucha masa korzeni wyraża się cyfrą 100 do 241%. Natomiast dodanie manganu

Ryc. 1. Doświadczenie I. Wpływ aeracji źródła azotu i manganu na wzrost kukurydzy
Experiment I. Effect of aeration, nitrogen and manganese on the growth of maize



Ryc. 1a



Ryc. 1b



Ryc. 1c



Ryc. 1d

a — NH_4 przewietrzane i nie przewietrzane; b — NO_3 przewietrzane i nie przewietrzane; c — NH_4 + Mn przewietrzane i nie przewietrzane; d — NO_3 + Mn przewietrzane i nie przewietrzane

a — NH_4 aerated and NH_4 no aerated; b — NO_3 aerated and NO_3 no aerated; c — NH_4 + Mn aerated and NH_4 + Mn no arerated; d — NO_3 + Mn aerated and NO_3 + Mn no aerated

Tabela 2 — Table 2

Wpływ aeracji, źródła azotu i Mn na wzrost kukurydzy

Effect of aeration, nitrogen source and Mn on the growth of maize plants

	Pożywka Solution	Sucha masa w g Dry matter in g		Wpływ aeracji na wzrost. Za 100% przyjęto nie przewietrzane Effect of aeratian on growth 100% without aeration		Wpływ źródła azotu na wzrost. Za 100% przyjęto formę NH_4 Effect of nitrogen source on growth. 100% NH_4 form		Wpływ Mn na wzrost. Za 100% przyjęto bez Mn Effect of Mn on growth. 100% without Mn	
		część nad-ziemna tops	korzenie roots	część nad-ziemna tops	korzenie roots	część nad-ziemna tops	korzenie roots	część nad-ziemna tops	korzenie roots
Przewietrzane Aerated	NH_4	7,82±0,93	3,04±0,18	225,6	241,4	100	100	100	100
	NO_3	9,77±0,79	3,71±0,22	161,6	174,5	123,8	129,1	100	100
	NH_4+Mn	8,30±0,43	2,38±0,26	122,0	127,1	100	100	105,9	78,4
	NO_3+Mn	9,88±0,26	4,27±0,34	137,4	160,6	120,4	179,1	103,0	115,2
Nie przewietrzane No aerated	NH_4	3,46±0,39	1,26±0,21	100	1C0	100	100	100	100
	NO_3	5,60±0,95	2,12±0,34	100	100	172,9	168,7	100	100
	NH_4+Mn	6,80±0,92	1,87±0,23	100	100	100	100	195,9	148,9
	NO_3+Mn	7,26±0,82	2,66±0,34	100	100	106,9	141,8	121,1	125,2

i przewietrzanie, w porównaniu z takimi samymi kombinacjami nie przewietrzanymi, wykazują nieznaczną stymulację wzrostu roślin, bo wynoszącą tylko 22% części nadziemnej i 27% korzeni. Rośliny rosnące na pożywce azotanowej wykazują mniejszą wrażliwość na przewietrzanie, a zwyżka suchej masy części nadziemnej wynosi 61,6 i 74,5% korzeni w porównaniu z analogiczną pożywką nie przewietrzaną. Dodanie manganu działa tutaj podobnie jak na pożywkach amonowych.

W p ł y w ź r ó d ł a a z o t u n a w z r o s t k u k u r y d z y. Przyjmując za 100% suchą masę roślin rosnących na pożywkach amonowych, dodatni wpływ azotu azotanowego szczególnie widoczny jest w kulturach nie przewietrzanych. Zwyżka suchej masy części nadziemnej roślin rosnących na pożywkach azotanowych w porównaniu z amonowymi wynosi 72,9 i 68,7% korzeni. Mniejszy, bo około 20%, był przyrost suchej masy części nadziemnej, natomiast około 80% wynosił przyrost suchej masy korzeni (fot.) na korzyść roślin rosnących na pożywkach azotanowych. W analogicznych kombinacjach nie przewietrzanych notujemy prawie nieistotny przyrost suchej masy części nadziemnej, lecz około 42% przyrost suchej masy korzeni.

W p ł y w m a n g a n u n a w z r o s t k u k u r y d z y. Za 100% przyjęto suchą masę roślin na pożywkach bez manganu. W kulturach przewietrzanych wpływ manganu okazał się znikomy, a na pożywce amonowej z dodatkiem manganu sucha masa korzeni uległa nawet zmniejszeniu. Natomiast w kulturach nie przewietrzanych dodatni wpływ manganu przejawił się jak najwyraźniej. Na pożywce amonowej nie przewietrzanej z manganem, w porównaniu z taką samą pożywką bez manganu, zwyżka suchej masy części nadziemnej wynosi 95,9 i 49,0% korzeni. Mniejszy wpływ manganu obserwujemy na pożywkach azotanowych nie przewietrzanych, ponieważ sucha masa części nadziemnej przewyższa o 21,1%, a korzeni o 25,2% suchą masę roślin z pożywek bez manganu.

W p ł y w a e r a c j i, ź r ó d ł a a z o t u, m a n g a n u n a E_h i rH w e w n ą t r z r o ś l i n y i p o ż y w k i. Tabela 3 przedstawia wyniki pomiarów potencjału oksydoredukcyjnego w łodydze wyrażonego w mv. Z tabeli wynika, że aeracja pożywki powoduje podwyższenie potencjału oksydoredukcyjnego wewnątrz rośliny w porównaniu z analogicznymi kombinacjami pozbawionymi tego zabiegu. Następnie notujemy wyższy potencjał oksydoredukcyjny roślin rosnących na pożywkach azotanowych w porównaniu z pożywkami amonowymi. Dodanie do pożywki manganu także powoduje podwyższenie poziomu E_h w porównaniu z pożywkami bez manganu. Przy analizie powyższych danych i porównaniu ich z wynikami tabeli 2 stwierdzamy ciekawą zależność: im wyższy potencjał oksydoredukcyjny w roślinie, tym roślina charakteryzuje się bujniejszym wzrostem. Wyniki pomiarów potencjału oksydoredukcyjnego pożywki

Tabela 3 — Table 3

Potencjał oksydoredukcyjny E_h w mv w łodydze na głębokości 0,5 cm*
Oxidation reduction potential E_h in mv on the stalk on depth of 0,5 cm

	Pożywka Culture solution	E_h w mv E_h in mv	
		I międzywęźle I internode	II międzywęźle II internode
Przewietrzane Aerated	NH_4	+423±8	+425±9
	NO_3	+459±7	+458±10
	NH_4+Mn	+453±9	+457±11
	NO_3+Mn	+495±6	+492±6
Nie przewietrzane No aerated	NH_4	+355±7	+352±6
	NO_3	+379±7	+375±6
	NH_4+Mn	+384±8	+380±7
	NO_3+Mn	+395±10	+390±8

* Średnie z 2 elektrod z 4 roślin. Average in 2 electrodes in 4 plants.

w okresie wegetacji wyrażonego w rH przedstawia tabela 4. Jakkolwiek różnice w rH są niewielkie (w rzędach pionowych) i ulegają znacznym wahaniom w okresie doświadczenia, przy czym występująca zwyżka rH w końcu doświadczenia trudna jest do wytłumaczenia, to jednak należy stwierdzić, że aeracja, azotany i mangan powodują wzrost rH pożywki w porównaniu z kombinacjami nie przewietrzanymi z azotem w formie amonowej i bez manganu.

W p ł y w a e r a c j i, ź r ó d ł a a z o t u i m a n g a n u n a z a w a r t o ś ć w r o ś l i n a c h c u k r ó w r o z p u s z c z a l n y c h i w o l n y c h k w a s ó w o r g a n i c z n y c h. W tabeli 5 przedstawiono wyniki oznaczeń cukrów rozpuszczalnych i wolnych kwasów organicznych w roślinach. Cukry oznaczano według mikrometody Bertranda, wolne kwasy organiczne według metody opisanej przez A. J. J e r m a k o w a i współpracowników (1954). Z tabeli widzimy, że aeracja powoduje zwiększenie wolnych kwasów organicznych w roślinie tak w części nadziemnej jak i w korzeniach, natomiast zmniejsza się pod wpływem tego zabiegu zawartość cukrów redukujących we wszystkich kombinacjach. W odniesieniu do sacharozy tej prawidłowości nie udało się ustalić. Azotany w porównaniu z amonową formą azotu powodują na ogół zwiększenie zawartości cukrów rozpuszczalnych tak w części nadziemnej jak i w korzeniach, chociaż w znacznie mniejszym stopniu. Na szczególną uwagę zasługuje wpływ manganu na zawartość cukrów rozpuszczalnych w roślinach. Dodanie manganu powoduje bardzo wyraźne zwiększenie zawartości tych substancji zarówno w części nadziemnej, jak i w korzeniach niezależnie od ujemnego wpływu aeracji i dodatniego wpływu azo-

Tabela 7 — Table 7

Wpływ aeracji, źródła azotu, Mn i Cu na wzrost kukurydzy

Effect of aeration, nitrogen source, Mn and Cu on the growth of maize

Pożywka Solution	Sucha masa w g Dry matter in g		Wpływ aeracji na wzrost. Za 100% przyjęto nie przewietrzane Effect of aeration on the growth. 100% without aeration		Wpływ źródła azotu na wzrost. Za 100% przyjęto formę NH_4 Effect of nitrogen source on the growth. 100% NH_4 form		Wpływ Mn na wzrost. Za 100% przyjęto bez Mn Effect of Mn on the growth. 100% without Mn		Wpływ Cu na wzrost. Za 100% przyjęto bez Cu Effect of Cu on the growth. 100% without Cu	
	część nadziemna tops	korzenie roots	część nadziemna tops	korzenie roots	część nadziemna tops	korzenie roots	część nadziemna toops	korzenie roots	część nadziemna tops	korzenie roots
Przewietrzane Aerated										
NH_4	5,177±0,73	1,79 ±0,13	244,1	202,2	100	100	100	100	100	100
NO_3	6,472±0,41	1,92 ±0,21	151,9	112,[illegible]	125,0	107,2	100	100	100	100
NH_4+Mn	5,712±0,94	1,59 ±0,22	165,4	215,6	100	100	110,3	111,1	—	—
NO_3+Mn	6,500±0,36	2,18 ±0,11	131,6	114,0	113,7	109,5	100,4	113,5	—	—
NH_4+Cu	5,625±0,65	1,97 ±0,19	190,6	169,8	100	100	—	—	108,6	110,0
NO_3+Cu	6,890±0,59	2,07 ±0,29	144,1	116,2	122,4	105,0	—	—	106,4	107,8
Nie przewietrzane No aerated										
NH_4	2,12 ±0,69	0,885±0,09	100	100	100	100	100	100	100	100
NO_3	4,26 ±0,83	1,700±0,11	100	100	200,9	192,0	100	100	100	100
NH_4+Mn	3,452±0,44	0,923±0,10	100	100	100	100	162,8	104,2	—	—
NO_3+Mn	4,937±0,91	1,912±0,08	100	100	143,0	207,1	115,8	112,4	—	—
NH_4+Cu	2,950±0,88	1,16 ±0,19	100	100	100	100	—	—	139,1	131,0
NO_3+Cu	4,842±0,81	1,78 ±0,10	100	100	164,1	153,4	—	—	113,2	104,7

Tabela 5 — Table 5

Wpływ aeracji, źródła azotu i Mn na zawartość cukrów rozpuszczalnych i wolnych kwasów organicznych w kukurydzy

Effect of aeration, nitrogen source and Mn on the soluble carbohydrates and free organic acids content in maize

	Pożywka Solution	Część nadziemna Tops			Korzenie Roots		
		cukry redukujące w % suchej masy reducing carbohydrates in % dry matter	sacharoza w % suchej masy saccharose in % dry matter	wolne kwasy organiczne w miliekwiwalentach na 100 g suchej masy the free organic acids in miliequivalents in 100 g dry matter	cukry redukujące w % suchej masy reducing carbohydrates in % dry matter	sacharoza w % suchej masy saccharose in % dry matter	wolne kwasy organiczne w miliekwiwalentach na 100 g suchej masy the free organic acids in miliequivalents on 100 g dry matter
Przewietrzane Aerated	NH_4	0,415	0,719	41,75	2,08	0,26	40,80
	NO_3	0,937	0,691	45,00	1,94	0,53	36,60
	NH_4+Mn	1,450	0,890	32,75	2,50	0,79	44,10
	NO_3+Mn	2,500	0,156	37,50	3,75	0,28	45,30
Nie przewietrzane No aerated	NH_4	1,875	0,306	35,25	2,91	0,40	34,50
	NO_3	3,645	0,990	38,00	2,77	0,93	27,60
	NH_4+Mn	3,332	0,790	26,87	3,75	0,39	30,00
	NO_3+Mn	4,150	0,980	28,75	4,16	0,66	24,00

tanów. Wpływ azotanów i manganu na zawartość w roślinach wolnych kwasów organicznych nie daje jasnego obrazu, gdyż nie obserwujemy prawidłowości, którą cechuje wpływ aeracji, azotanów i manganu na zawartość wolnych kwasów organicznych.

Kompensacja niedoboru tlenu przez azotany i mangan. Zagadnienie to podjęte przez D. J. Arnona (1937) oraz stwierdzenie możliwości kompensacji niedoboru tlenu przez azotany przy oddychaniu korzeni pomidorów przez S. Gumińskiego i współpracowników (1957) uzyskało potwierdzenie w naszym doświadczeniu. Tabela 6 podaje zmiany zawartości tlenu w pożywce w czasie trwania doświadczenia. Tlen oznaczano po okresie nocnym między godzinami 7^{30}—8^{30} rano. Kultury przewietrzane po 10 godzinach tego zabiegu wykazywały 90—95% nasycenia tlenem pożywki. Z tabeli wynika, iż niezależnie od dużych wahań w zawartości tlenu w pożywkach w okresie wegetacji w kulturach przewietrzanych z azotem w formie azotanowej i manganem zawartość tlenu jest wyższa niż w analogicznych pożywkach nie przewietrzanych, z azotem w formie amonowej i bez manganu. Porównanie tabeli 6 z 4 nie daje korelacji między procentem nasycenia tlenem pożywki i poziomem rH. Trzeba podkreślić, że podane zawartości tlenu w pożywce nie dają istotnego obrazu o możliwości kompensacji niedoboru tlenu przez azotany i mangan ze względu na różnice w wielkościach systemu korzeniowego roślin w poszczególnych kombinacjach. Możliwość kompensacji niedoboru tlenu przez korzenie powietrzne nie jest brana pod uwagę, gdyż ilość tych korzeni w kulturach przewietrzanych i nie przewietrzanych w stosowanych kombinacjach wahała się od 8—11 sztuk na roślinie, nie wykazując jakichkolwiek prawidłowości, przeto dane te nie są brane pod uwagę. Aby móc przekonać się o rzeczywistej kompensacji niedoboru tlenu w pożywce przez azotany i mangan, należałoby odnieść ilość pobranego tlenu w ciągu określonego czasu do znanej masy korzeni.

Pobieranie azotu przez kukurydzę w zależności od aeracji, źródła azotu, dodatku do pożywki manganu lub miedzi

DOŚWIADCZENIE II

H. Burström (1939) wykazał, że mangan stymuluje pobieranie azotanów przez korzenie kukurydzy, interesujące więc wydawało się zbadanie wpływu manganu na pobieranie jonów amonowych i azotanowych przez rośliny kukurydzy. Pobieranie jonów jest jedną z najważniejszych fizjologicznych funkcji roślin, a zależność pobierania jonów od oddycha-

nia nie ulega wątpliwości i została potwierdzona przez licznych badaczy (D. R. Hoagland i T. C. Broyer, 1936, P. Prevot i F. C. Steward 1933, H. Lundegardh 1947).

Metodyka badań

Pobieranie azotu przez kukurydzę w czasie wegetacji oznaczano kolorymetrycznie wg metody opisanej przez N. L. Allporta (1947) i stosowanej przez J. A. Beckinga (1956) w badaniach nad mechanizmem pobierania jonów NH_4 przez kukurydzę. Do oznaczeń okresowo pobierano z wazonów odpowiednie ilości pożywki i oznaczano w niej zawartość azotu. Azot azotanowy oznaczano wg metody opisanej przez C. Olsena (1950). Oznaczenia zarówno jonów NH_4, jak i NO_3 wykonywano na Uniwersalnym Fotometrze typu U. F.-56 przy zastosowaniu filtrów dla NH_4 M-47, dla NO_3 M-43. Standartowe krzywe wykreślono na podstawie oznaczeń wzorcowego roztworu pożywki zawierającej znane ilości jonów NH_4 i NO_3. Pozostała procedura metodyczna stosowana w tym doświadczeniu jest analogiczna do opisanej w doświadczeniu I. Doświadczenie przeprowadzono wg schematu:

Przewietrzane:	NH_4	NO_3+Mn
	NO_3	NH_4+Cu
	NH_4+Mn	NO_3+Cu

Nie przewietrzane: idem

Miedź dodano w ilości 0,05 mg/l w formie $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. pH ustalono na 6,0 i utrzymywano na stałym poziomie w okresie wegetacji.

Przebieg wegetacji

28.IV.1959 r. kiełkowano nasiona kukurydzy na wodzie destylowanej (nasiona tej samej kukurydzy, które użyto w doświadczeniu I stosowano we wszystkich doświadczeniach tej pracy). 2.V siewki roślin przeniesiono na pożywki do 2-litrowych wazonów i hodowano w szklarni. 8.V po odcięciu nasion siewki przeniesiono do 4,5 l słojów i zaczęto przewietrzanie. Po 2 tygodniach od chwili, kiedy zaczęto przewietrzanie pożywek, obserwowano dodatnią reakcję na ten czynnik, największą na pożywce amonowej bez manganu i miedzi, mniejszą z dodaniem tych mikroelementów do pożywki. Zauważono, że dodatnia była reakcja na przewietrzanie pożywki także u roślin rosnących na pożywkach azotanowych, jednak znacznie mniej wyraźna niż na pożywkach amonowych. Z biegiem czasu

te zauważone różnice bardzo silnie pogłębiły się. W okresie wegetacji roślin poczyniono interesujące obserwacje. Mianowicie nagłe zachmurzenie i nieznaczne obniżenie temperatury (o 2—4°C) w ciągu dnia powodowały wystąpienie na liściach roślin kropel roztworu guttacyjnego. Oceniając porównawczo najsilniejszą guttację obserwowano u roślin rosnących na pożywkach azotanowych tak przewietrzanych jak i pozbawionych tego zabiegu. W tymże czasie notowano o wiele słabszą guttację na pożywkach amonowych przewietrzanych, a na pożywkach nie przewietrzanych często w ogóle nie można było zauważyć kropel roztworu guttacyjnego bądź proces ten był o wiele słabszy niż u roślin rosnących na pożywkach azotanowych oraz w mniejszym stopniu na pożywkach amonowych, lecz wietrzonych. Obserwacje występowania guttacji u tych roślin zaraz po zapadnięciu zmroku potwierdziły opisaną wyżej ocenę intensywności guttacji. 15.VI rośliny sfotografowano, oddzielono część nadziemną od korzeni, a z materiałem roślinnym postępowano jak w doświadczeniu I.

Omówienie wyników

Tabela 7 przedstawia wyniki doświadczenia w odniesieniu do suchej masy roślin. Podobnie jak w doświadczeniu I największy dodatni wpływ aeracji na wzrost roślin przejawił się na pożywce amonowej przewietrzanej, w porównaniu ze wzrostem roślin na tej samej pożywce, lecz nie wietrzonej. Duży dodatni wpływ aeracji notujemy także na pożywce amonowej zarówno z manganem, jak i miedzią. Wpływ tych mikroelementów na wzrost roślin na pożywkach azotanowych okazał się znacznie mniejszy. Z tabeli 7 wynika, że działanie aeracji na pożywce azotanowej przejawiło się znacznie wyraźniej w odniesieniu do części nadziemnej niż w stosunku do korzeni. W odniesieniu do wpływu źródła azotu na wzrost roślin z tabeli 7 odczytać można, co następuje: w grupie roślin rosnących na pożywkach przewietrzanych notujemy stosunkowo nieznaczną stymulację wzrostu roślin z pożywek azotanowych w stosunku do roślin z pożywek amonowych. Natomiast w grupie roślin nie przewietrzanych dodatni wpływ azotu w formie azotanowej przejawił się bardzo wyraźnie. Również znaczną stymulację wzrostu notujemy w odniesieniu do roślin rosnących na pożywkach azotanowych z dodatkiem Mn lub Cu w porównaniu z analogicznymi kombinacjami amonowymi. Dodanie Mn lub Cu do pożywki w grupie roślin przewietrzanych nie okazało znaczniejszego wpływu na wzrost roślin zarówno na pożywce amonowej, jak i azotanowej. Przyrost suchej masy pod wpływem tych mikroelementów waha się w granicach błędu doświadczalnego (100,4—113,5%). Znikomy jest również wpływ Mn i Cu w grupie roślin nie przewietrzanych z pożywek azo-

Tabela 7 — Table 7

Wpływ aeracji, źródła azotu, Mn i Cu na wzrost kukurydzy

Effect of aeration, nitrogen source, Mn and Cu on the growth of maize

Pożywka Solution	Sucha masa w g Dry matter in g		Wpływ aeracji na wzrost. Za 100% przyjęto nie przewietrzane Effect of aeration on the growth. 100% without aeration		Wpływ źródła azotu na wzrost. Za 100% przyjęto formę NH_4 Effect of nitrogen source on the growth. 100% NH_4 form		Wpływ Mn na wzrost. Za 100% przyjęto bez Mn Effect of Mn on the growth. 100% without Mn		Wpływ Cu na wzrost. Za 100% przyjęto bez Cu Effect of Cu on the growth. 100% without Cu	
	część nadziemna tops	korzenie roots	część nadziemna tops	korzenie roots	część nadziemna tops	korzenie roots	część nadziemna toops	korzenie roots	część nadziemna tops	korzenie roots
Przewietrzane Aerated										
NH_4	5,177±0,73	1,79 ±0,13	244,1	202,2	100	100	100	100	100	100
NO_3	6,472±0,41	1,92 ±0,21	151,9	112,[illegible]	125,0	107,2	100	100	100	100
NH_4+Mn	5,712±0,94	1,59 ±0,22	165,4	215,6	100	100	110,3	111,1	—	—
NO_3+Mn	6,500±0,36	2,18 ±0,11	131,6	114,0	113,7	109,5	100,4	113,5	—	—
NH_4+Cu	5,625±0,65	1,97 ±0,19	190,6	169,8	100	100	—	—	108,6	110,0
NO_3+Cu	6,890±0,59	2,07 ±0,29	144,1	116,2	122,4	105,0	—	—	106,4	107,8
Nie przewietrzane No aerated										
NH_4	2,12 ±0,69	0,885±0,09	100	100	100	100	100	100	100	100
NO_3	4,26 ±0,83	1,700±0,11	100	100	200,9	192,0	100	100	100	100
NH_4+Mn	3,452±0,44	0,923±0,10	100	100	100	100	162,8	104,2	—	—
NO_3+Mn	4,937±0,91	1,912±0,08	100	100	143,0	207,1	115,8	112,4	—	—
NH_4+Cu	2,950±0,88	1,16 ±0,19	100	100	100	100	—	—	139,1	131,0
NO_3+Cu	4,842±0,81	1,78 ±0,10	100	100	164,1	153,4	—	—	113,2	104,7

tanowych (104,7—115,8%). Bardzo silnie natomiast zareagowały na dodanie do pożywek tych mikroelementów rośliny rosnące na pożywkach amonowych nie wietrzonych.

Tabela 8 przedstawia dane o intensywności i ilościach pobieranego azotu z pożywek w okresie wegetacji w zależności od aeracji, źródła azotu, dodatku do pożywki Mn lub Cu. Z tabeli tej widzimy, że:

1. W warunkach naszego doświadczenia azot azotanowy jest intensywniej pobierany przez kukurydzę w ciągu całego okresu wegetacji niezależnie od wymienionych czynników niż azot amonowy.

2. Azot azotanowy jest prawie jednakowo intensywnie pobierany przez kukurydzę w okresie wegetacji niezależnie od aeracji i dodatku do pożywki Mn lub Cu. Różnice w ilości i intensywności pobranego azotu azotanowego, wynikające z działania aeracji, Mn lub Cu, wskazują na pewny, aczkolwiek niewielki, stymulujący wpływ tych czynników na pobieranie azotu azotanowego przez kukurydzę.

3. Ogólne ilości pobranego z pożywek azotu azotanowego są we wszystkich kombinacjach wyższe od tych wartości dla pożywek amonowych. Szczególnie duże różnice wynikają przy porównaniu kombinacji nie przewietrzanych na korzyść pożywek azotanowych. Z analizy danych charakteryzujących ogólne ilości pobranego azotu przez kukurydzę w czasie doświadczenia z pożywek amonowych i azotanowych wynika, że największe różnice w ilości pobranego azotu wykazuje kombinacja NO_3 nie przewietrzana — 198 mg pobranego N wobec 98 mg N pobranego przez 1 roślinę z analogicznej pożywki amonowej. Mniejsze, chociaż wyraźne, różnice w ilości pobranego azotu przez rośliny notujemy na korzyść kombinacji azotanowych z dodatkiem Mn lub Cu w porównaniu z analogicznymi kombinacjami amonowymi. Dane cyfrowe charakteryzujące pobieranie azotu amonowego wykazują, że największy dodatni wpływ na ten proces wywiera aeracja pożywki. Działanie Mn lub Cu przejawiło się wyraźnie tylko na pożywkach amonowych nie przewietrzanych. W kombinacjach przewietrzanych wpływ tych mikroelementów jest w działaniu podobny do ich wpływu na pobieranie azotu azotanowego. Jakkolwiek działanie Mn i Cu jest podobne, należy podkreślić, że we wszystkich wypadkach mangan powodował nieco większy stymulujący wpływ na pobieranie azotu tak amonowego jak i azotanowego niż miedź.

W tabeli 9 przedstawione są wyniki oznaczeń cukrów rozpuszczalnych i wolnych kwasów organicznych w roślinach. Dane tabeli całkowicie potwierdzają wyniki doświadczenia I. Również w tym doświadczeniu stwierdzamy dodatni wpływ Mn oraz Cu na zawartość w roślinach cukrów rozpuszczalnych. Nie uzyskano jasnego

Tabela 8 — Table 8

Pobieranie azotu przez kukurydzę w zależności od aeracji, źródła azotu, doda'ku do pożywki Mn lub Cu

Nitrogen uptake by maize plants in relation to aeration, nitrogen source, Mn or Cu added in culture

	Pożywka NH_4 NH_4 solution	mg N pobranego przez 1 roślinę mg N uptake by 1 plant			pożywka NO_3 NO_3 solution	mg N pobranego przez 1 roślinę mg N uptake by 1 plant		
		po 11 dniach after 11 days	po 26 dniach after 26 days	po 39 dniach after 3) days		po 11 dniach fter 11 days	po 26 dniach after 26 days	po 39 dniach after 39 days
Przewietrzane Aerated	NH_4	21	92	185	NO_3	30	101	206
	NH_4+Mn	26	101	199	NO_3+Mn	38	106	218
	NH_4+Cu	25	97	185	NO_3+Cu	33	111	210
Nie prze- wietrzane No aerated	NH_4	11	30	98	NO_3	11	95	198
	NH_4+Mn	18	56	152	NO_3+Mn	27	100	204
	NH_4+Cu	17	52	128	NO_3+Cu	24	98	202

Tabela 9 — Table 9

Wpływ aeracji, źródła azotu, Mn i Cu na zawartość cukrów rozpuszczalnych i wolnych kwasów organicznych w kukurydzy

Effect of aeration, nitrogen source, Mn and Cu on the soluble carbohydrates and free organic acids content in maize

	Pożywka Solution	Część nadziemna Tops			Korzenie Roots		
		cukry redukujące w % suchej masy reducing carbohydrates in % dry matter	sacharoza w % suchej masy saccharose in % dry matter	wolne kwasy organiczne w miliekwiwalentach na 100 g suchej masy the free organic acids in miliequivalents on 100 g dry matter	cukry redukujące w % suchej masy reducing carbohydrates in % dry matter	sacharoza w % suchej masy saccharose in % dry matter	wolne kwasy organiczne w miliekwiwalentach na 100 g suchej masy the free organic acids in miliequivalents on 100 g dry matter
Przewietrzane Aerated	NH_4	3,85	1,61	69,0	4,15	0,81	71,8
	NO_3	5,00	1,56	72,4	5,41	0,76	71,9
	NH_4+Mn	6,17	0,59	63,2	5,50	0,23	77,6
	NO_3+Mn	8,00	1,70	67,5	6,30	0,19	75,8
	NH_4+Cu	5,65	1,00	64,1	5,50	0,92	79,1
	NO_3+Cu	6,65	1,20	60,0	6,40	1,28	79,6
Nie przewietrzane No aerated	NH_4	7,05	0,57	43,0	3,90	0,42	60,3
	NO_3	6,80	1,04	46,0	6,80	0,54	62,4
	NH_4+Mn	7,80	0,95	57,5	4,25	0,54	66,0
	NO_3+Mn	7,80	2,09	59,0	8,65	0,03	66,1
	NH_4+Cu	6,85	1,28	40,1	6,65	0,09	57,5
	NO_3+Cu	8,80	1,06	45,7	9,95	0,10	59,3

obrazu o wpływie Mn i Cu na zawartość w roślinach wolnych kwasów organicznych. Zwraca uwagę kilkakrotnie większa ilość cukrów redukujących w stosunku do sacharozy.

Wpływ aeracji, źródła azotu i manganu na parcie korzeniowe roślin kukurydzy

DOŚWIADCZENIE III i IV

Zagadnienie to podjęto z następujących powodów:

1. W doświadczeniu II zwrócono uwagę na różną intensywność guttacji u roślin w zależności od źródła azotu w pożywce.

2. W badaniach nad asymilacją azotu przez rośliny po długotrwałym głodzie azotowym (opisane będą w II części pracy) stwierdzono, że rośliny, którym dodano do pożywki azot azotanowy, wykazywały intensywniejszą guttację niż rośliny, którym dodano azot w formie amonowej. Obserwacje te sugerowały, że system korzeniowy roślin rosnących na pożywkach azotanowych wykazuje większą metaboliczną aktywność niż roślin z pożywek amonowych.

3. Interesowało nas, jak zareagują rośliny kukurydzy na krótkotrwałe, lecz intensywne wietrzenie pożywki.

4. Czy aeracja, źródła azotu i dodanie do pożywki Mn wykażą wpływ na skład aminokwasowy soku płaczu roślin.

Metodyka badań

1. A e r a c j ę p o ż y w k i przeprowadzono przy pomocy kompresora. Układ przewietrzający był następujący: do kompresora podłączono grubościenną rurkę gumową, która z kolei była połączona systemem rozgałęźników szklanych z jednakowej długości rurkami gumowymi zakończonymi rurkami szklanymi. Rurki szklane wkładano do wazonów z pożywką. Taki układ przewietrzający gwarantował możliwie równomierne wtłaczanie powietrza do wazonów z pożywką. W ciągu 15 minut przepuszczano przez pożywkę w każdym wazonie ok. 15 l powietrza. Przewietrzanie odbywało się 3 razy dziennie: w godzinach 8^{00}, 13^{00} i 19^{00}.

2. B a d a n i a s k ł a d u a m i n o k w a s o w e g o s o k u p ł a c z u. Badania przeprowadzono na zbuforowanej bibule chromatograficznej Whatman Nr 1 wg E. F. M a c F a r r e n a i J. A. M i l l s a (1952). Metoda ma tę zaletę, że obniża niekorzystny wpływ obecności soli w roztworze

na rozdział aminokwasów na bibule. W naszych badaniach stosowano system rozpuszczalników fenol-bufor fosforanowy o pH 12. Buforem tym nasycano bibułę, po czym suszono w temperaturze pokojowej. Przed naniesieniem soku płaczu na bibułę równe ilości oczyszczonego fenolu mieszano z roztworem buforowym o pH 12 w rozdzielaczu. Po rozdzieleniu się faz dolną warstwę używano jako rozpuszczalnika. Stosowano metodę chromatografii wstępującej. Wzorcami były 0,1% roztwory aminokwasów. Badany roztwór nanoszono kilkakrotnie na bibułę w 1 punkt w ogólnej ilości 50 μl. Proces chromatograficzny zachodził w temperaturze pokojowej. Po przejściu rozpuszczalnika przez bibułę suszono ją w ciągu 2 godzin na powietrzu, po czym w ciągu 30 minut w suszarce elektrycznej z dobrą wentylacją w temperaturze 60°C. Wywoływano chromatogram butanolowym roztworem ninhydryny, do którego dodano lodowatego kwasu octowego do ogólnego stężenia 4% w celu zobojętnienia bibuły. Po spryskaniu bibuły roztworem ninhydryny w ciągu 15 minut chromatogram suszono na powietrzu, po czym w ciągu 30 minut w dobrze przewietrzanej suszarce elektrycznej w temperaturze 60°C. Przy zastosowaniu wymienionej procedury na bibule otrzymywano wyraźne plamy aminokwasów bez „ogonów" i zacieków.

3. Badania jakościowe soku płaczu przeprowadzono następująco:

a) azot azotanowy wykrywano w reakcji z dwufenyloaminą w stężonym kwasie siarkowym,

b) azot amonowy wykrywano z odczynnikiem Nesslera,

c) próby na cukry wykonywano w reakcji Molischa,

d) próby na białko: ksantoproteinową, Millona i biuretową wykonywano w następujący sposób: po dodaniu do soku płaczu 96% etanolu, tak aby końcowe jego stężenie w soku płaczu wynosiło 80%, wytrąca się biały kłaczkowaty osad; po odparowaniu etanolu w suszarce próżniowej w temperaturze 40°C otrzymuje się biały proszkowaty osad, z którym wykonywano próby na białko,

e) pH soku płaczu oznaczano potencjometrycznie przy pomocy pehametru lampowego. Sposób zbierania soku płaczu opisany będzie niżej. Pozostała procedura metodyczna jest analogiczna do opisanej w doświadczeniu I. pH pożywki ustalono na 6,0 i utrzymywano na stałym poziomie w czasie trwania doświadczenia. Powtórzenia 4-krotne.

Przebieg wegetacji

28.V.1959 r. kiełkowano nasiona kukurydzy na wodzie destylowanej i po tygodniu, po odcięciu nasion, siewki przeniesiono na pożywki do 4,5 l słojów i zaczęto przewietrzanie. W czasie wegetacji notowano różnice we

wzroście roślin podobne do opisanych w doświadczeniach I i II. Szczególną uwagę zwrócono na występowanie guttacji na roślinach w dzień w czasie zachmurzenia i wieczorami. Poczynione obserwacje całkowicie potwierdziły dane odnoszące się do doświadczenia II oraz obserwacje, które będą opisane w II części pracy. 26.VI rośliny sfotografowano. Fotografie przedstawiają stan roślin na 2 dni przed likwidacją doświadczenia.

Zbiór soku płaczu z roślin kukurydzy

28.VI po słonecznym i ciepłym dniu o godzinie 19^{00} do 19^{30} ścięto część nadziemną roślin na wysokości około 5 cm od szyjki korzeniowej i nałożono na pieńki kauczukowe zbiorniki na sok płaczu. Przed ścinaniem części nadziemnej miejsce, w którym dokonywano cięcia, przecierano etanolem. Zbiornikami były kauczukowe smoczki na butelkę, które przed założeniem na pieniek dobrze wymyto i także przetarto watą nasyconą etanolem. W zbiorniku przed momentem założenia go na pieniek wycinano mały otwór i rozciągając go zakładano na pieniek. W ten sposób uzyskano dobrą szczelność zbiorników. Szeroki otwór zbiornika zakrywano sterylną watą. Wydzielany prawie natychmiast sok płaczu zbierano mikropipetką do probówek. Sok płaczu zbierano tak, aby nie dotykać pieńka rośliny końcem pipety. Sok płaczu stanowił zupełnie klarowny roztwór. Po 4 godzinach wydzielony sok płaczu poddano badaniu w kolejności:

1) zmierzono objętość,

2) naniesiono po 50 μl roztworu na bibułę chromatograficzną i rozwijano chromatogram,

3) oznaczono pH,

4) wykonano próby na zawartość w soku płaczu białka, cukrów, azotu amonowego i azotanowego.

Tegoż samego dnia (29.VI), lecz już rano, zebrano następną porcję wydzielonego przez noc soku płaczu i poddano badaniom jak wyżej. Część nadziemną i korzenie traktowano wg standartowych metod opisanych w doświadczeniu I.

Wyniki doświadczenia III

Tabela 10 przedstawia wyniki doświadczenia w odniesieniu do suchej masy roślin. Dane tego doświadczenia całkowicie potwierdzają wyniki uzyskane w doświadczeniach poprzednich. Wynika stąd wniosek, że krótkotrwała, lecz intensywna aeracja pożywki jest w swoim działaniu nie mniej skuteczna niż aeracja ciągła, lecz mniej intensywna.

Tabela 10 — Table 10

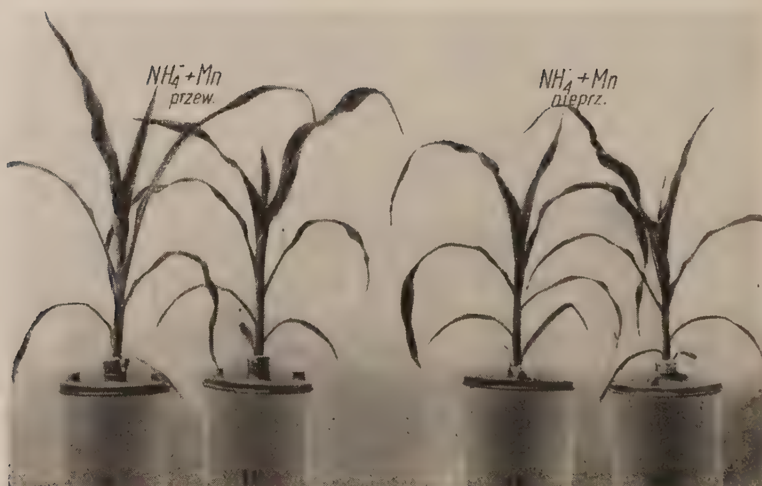
Wpływ aeracji, źródła azotu i Mn na wzrost kukurydzy

Effect of aeration, nitrogen source and Mn on the growth of maize

	Pożywka Solution	Sucha masa w g Dry matter in g		Wpływ aeracji na wzrost. Za 100 % przyjęto nie przewietrzane Effect of aeration on the growth. 100% without aeration		Wpływ źródła azotu na wzrost. Za 100% przyjęto formę NH_4 Effect of nitrogen source on the growth. 100% NH_4 form		Wpływ Mn na wzrost. Za 100% przyjęto bez Mn Effect of Mn on the growth. 100% without Mn	
		część nadziemna tops	korzenie roots	część nadziemna tops	korzenie roots	część nadziemna tops	korzenie roots	część nadziemna tops	korzenie roots
Przewietrzane Aerated	NH_4	2,81±0,30	1,09±0,04	248,6	281,6	100	100	100	100
	NO_3	3,34±0,29	1,03±0,09	122,3	128,7	118,8	94,5	100	100
	NH_4+Mn	2,73±0,18	0,97±0,07	135,1	186,5	100	100	97,1	88,9
	NO_3+Mn	3,52±0,21	1,20±0,03	116,1	135,2	128,9	123,7	105,3	116,5
Nie przewietrzane No aerated	NH_4	1,13±0,08	0,387±0,015	100	100	100	100	100	100
	NO_3	2,73±0,18	0,80 ±0,01	100	100	241,5	206,1	100	100
	NH_4+Mn	2,02±0,10	0,52 ±0,013	100	100	100	100	178,7	134.3
	NO_3+Mn	3,13±0,09	0,887±0,021	100	100	154,9	170,5	110,9	110,8

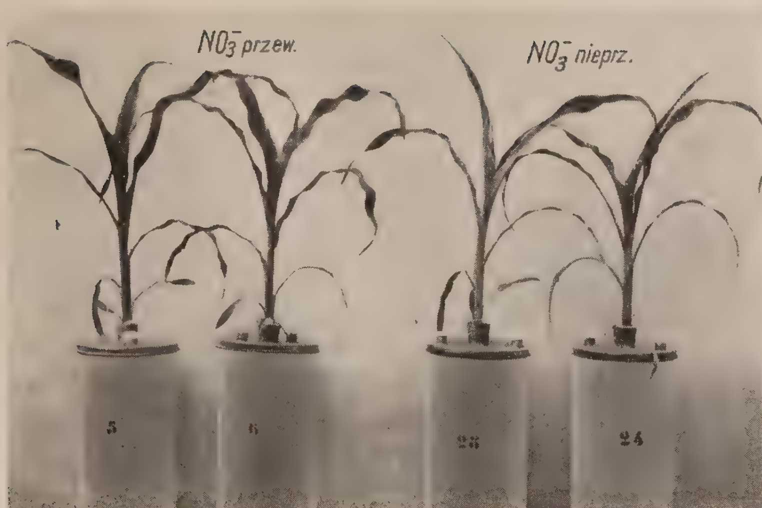


a

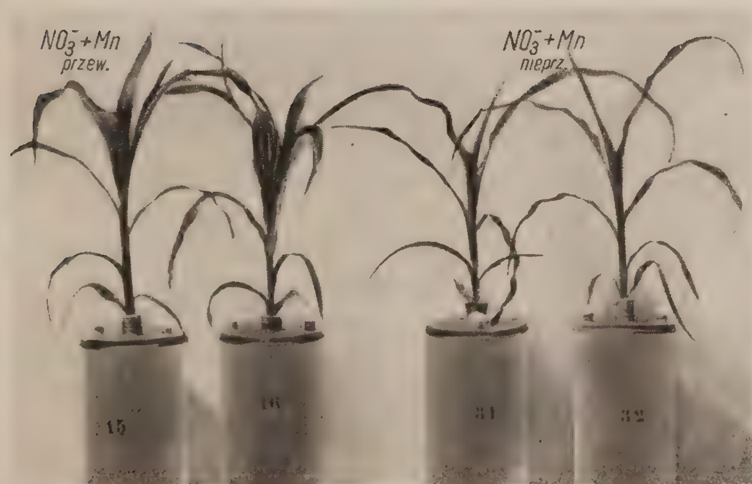


c

Ryc. 2. Doświadczenie III. Wpływ aeracji, źródła azotu i manganu na wzrost kukurydzy. Objaśnienia jak na ryc. 1



b



d

Experiment III. Effect of aeration, nitrogen source and manganese on the growth of maize. Description as in the fig. 1

Tabela 11 przedstawia wyniki doświadczenia w odniesieniu do ilości wydzielonego soku płaczu przez 1 roślinę, po 4 i po 12 godzinach od chwili ścięcia części nadziemnej roślin, oraz pH soku płaczu.

Tabela 11 — Table 11

Wpływ aeracji, źródła azotu i manganu na parcie korzeniowe kukurydzy
Effect of aeration, nitrogen source and manganese on the root pressure of maize

	Pożywka Solution	ml wydzielonego soku płaczu przez 1 roślinę ml bleeding sap exudated by 1 plant		pH soku płaczu pH of bleeding sap	
		po 4 godzinach after 4 hours	po 12 godzinach after 12 hours	po 4 godzinach after 4 hours	po 12 godzinach after 12 hours
Przewietrzane Aerated	NH_4	1,95	4,95	6,85	5,70
	NO_3	4,15	14,45	6,60	5.90
	NH_4+Mn	2,95	8,05	7,20	5,80
	NO_3+Mn	4,60	17,20	6,50	5,80
Nie przewietrzane No aerated	NH_4	0,85	2,35	7,20	5,80
	NO_3	2,50	10,50	6,70	5,80
	NH_4+Mn	1,55	3,55	6,50	5,80
	NO_3+Mn	4,00	13,80	6,00	5,80

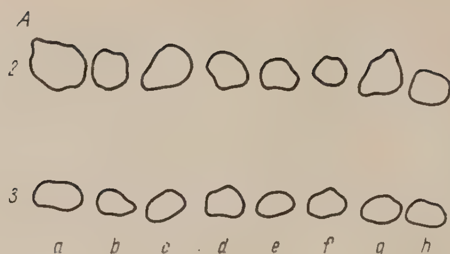
Z tabeli wynika, że najwięcej soku płaczu wydzieliły rośliny rosnące na pożywce azotanowej przewietrzanej z dodatkiem manganu, następnie rośliny z pożywek azotanowych przewietrzanych bez manganu. Podobne wyniki uzyskano z roślinami rosnącymi na pożywkach azotanowych nie wietrzonych. Z roślin rosnących na pożywkach amonowych w analogicznym czasie najwięcej soku płaczu wydzieliły rośliny w kombinacji amonowej wietrzonej z dodatkiem manganu, mniej na tej pożywce bez manganu. Na pożywce amonowej nie przewietrzanej najwięcej soku płaczu zebrano z roślin rosnących na pożywkach z dodatkiem manganu. Najmniejsze ilości soku płaczu wydzieliły rośliny rosnące na pożywkach amonowych nie wietrzonych. Z tabeli 11 wynika, że system korzeniowy roślin rosnących na pożywkach azotanowych wykazuje kilkakrotnie większą metaboliczną aktywność w procesie czynnego pochłaniania i wydalania wody przez rośliny tak w kulturach przewietrzanych jak i nie przewietrzanych w porównaniu z roślinami rosnącymi na pożywkach amonowych. Zwraca uwagę dodatni wpływ na ten proces dodatku do pożywki man-

ganu we wszystkich kombinacjach jakkolwiek mniejszy niż wpływ azotanów. Duży dodatni wpływ na proces czynnego pochłaniania i wydalania wody przez rośliny wykazała aeracja, największy na pożywkach amonowych i mniejszy na pożywkach azotanowych. Interesujący jest fakt znacznej obniżki pH soku płaczu po 12 godzinach w porównaniu z tymi wartościami dla soku płaczu zebranego po 4 godzinach od chwili ścięcia części nadziemnej roślin. Próby na zawartość w soku płaczu azotu amonowego wypadły dodatnio we wszystkich kombinacjach. Próby na zawartość w soku płaczu azotu azotanowego z pożywek azotanowych były dodatnie zarówno po 4, jak i po 12 godzinach od chwili ścięcia części nadziemnej roślin. Dodatnie były również próby na zawartość w soku płaczu azotanowego zebranego z roślin rosnących na pożywkach amonowych po 12 godzinach od chwili ścięcia części nadziemnej roślin. Należy przypuszczać, że wynik ten mógł być spowodowany bądź procesem nitryfikacji, bądź też działaniem enzymów zawartych w wydzielonym soku płaczu, albo sumą tych obu procesów. Próby na zawartość cukrów w soku płaczu były we wszystkich kombinacjach dodatnie, jednakże ich ilości były niewystarczające, aby je można było oznaczyć mikrometodą Bertranda.

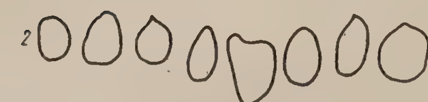
Wielce interesująco wypadły próby na zawartość białka. Mianowicie po dodaniu do soku płaczu 96% etanolu lub nasyconego roztworu tanniny wypadał biały kłaczkowaty osad, największy w soku płaczu z pożywek azotanowych, a o wiele mniejszy z pożywek amonowych. Wyszczególnione w części metodycznej próby na białko we wszystkich kombinacjach wypadły dodatnio. Wyniki te mogą być bardzo interesujące ze względu na warunki syntezy białka w zależności od podawanego roślinom źródła azotu.

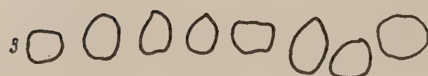
W wyniku analiz chromatograficznych uzyskano następujące dane: we wszystkich kombinacjach w soku płaczu, zebranym po 4 godzinach od chwili ścięcia części nadziemnej roślin, stwierdzono obecność kwasu glutaminowego i alaniny (bardzo silnie zabarwiona plama), natomiast po 12 godzinach stwierdzono kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, alaninę (bardzo intensywna plama) oraz walinę (słabo zabarwiona plama). Ponieważ w tym układzie rozpuszczalników alanina i glutamina nie rozdzielają się, należy przypuszczać, że bardzo silnie zabarwiona plama odpowiadająca alaninie zawiera również glutaminę. Schematy chromatogramów przedstawiają wielkość i położenie plam na bibule.

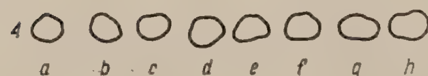
Na podstawie analiz chromatograficznych soku płaczu, w układzie rozpuszczalników fenol-bufor fosforanowy o pH 12, nie uzyskano danych świadczących o wpływie aeracji, źródła azotu i manganu na skład aminokwasowy soku płaczu.











Ryc. 3. Chromatogramy soku płaczu kukurydzy: *A* — po 4 godzinach od chwili ścięcia części nadziemnej; *B* — po 12 godzinach od chwili ścięcia części nadziemnej
The chromatograms of bleeding sap from maize plants. *A* — 4 hours after cuting the top; *B* — 12 hours after cuting the top

Aminokwasy: *1* — walina; *2* — alanina; *3* — kwas glutaminowy; *4* — kwas asparaginowy. Oznaczenia: *a* — NH_4 przewietrzane; *b* — NO_3 przewietrzane; c — NH_4+Mn przewietrzane; *d* — NO_3+Mn przewietrzane; *e* — NH_4 nie przewietrzane; *f* — NO_3 nie przewietrzane; *g* — NH_4+Mn nie przewietrzane; *h* — NO_3+Mn nie przewietrzane

Amino acids: *1* — valine; *2* — alanine; *3* — glutamic acid; *4* — aspartic acid. Descriptions: *a* — NH_4 aerated; *b* — NO_3 aerated; *c* — NH_4+Mn aerated; *d* — NO_3+Mn aerated; *e* — NH_4 no aerated; *f* — NO_3 no aerated; *g* — NH_4+Mn no aerated; *h* — NO_3+Mn no aerated

Tabela 12 przedstawia wyniki oznaczeń cukrów rozpuszczalnych i wolnych kwasów organicznych w roślinach. Dane tej tabeli potwierdzają wyniki uzyskane w doświadczeniach I i II.

Wyniki doświadczenia IV

Dane uzyskane w doświadczeniu III skłoniły nas do przeprowadzenia badań mających na celu wyjaśnienie:

1) w jakim stopniu azotany względnie sole amonowe stymulują proces czynnego pochłaniania i wydalania wody przez rośliny, które rosły w jednakowych warunkach na pożywkach z azotem w formie NH_4NO_3 i następnie zostały przeniesione na pożywki amonowe i azotanowe,

2) czy skład aminokwasowy tych roślin wykaże różnice,

3) czy uzyskamy potwierdzenie wyników doświadczenia III odnośnie zmian pH soku płaczu, wydzielanego białka, oraz czy azotany, które wykryto w soku płaczu zebranym po 12 godzinach od chwili ścięcia części nadziemnej z pożywek amonowych, były wynikiem działalności bakterii nitryfikacyjnych, czy też enzymów wydzielanych z sokiem płaczu. W tym celu przeprowadzono doświadczenie z kukurydzą w kulturach wodnych. Użyto pożywki azotanowej, zamieniając $Ca(NO_3)_2$ ekwiwalentną ilością NH_4NO_3. 20.VII.1959 r. kiełkowano nasiona kukurydzy na wodzie destylowanej i po tygodniu przeniesiono do 4,5-litrowych słojów szklanych, umieszczając o 1 roślinie w każdym słoju. pH ustalono na 6,0. Kultury nie były wietrzone. Pozostała procedura metodyczna była analogiczna do opisanej w doświadczeniu I. 18.VIII wybrano jednakowe siewki i, po dokładnym przemyciu systemu korzeniowego wodą wodociągową i destylowaną, przeniesiono na przygotowane pożywki:

NH_4 — 10 roślin
NO_3 — 10 roślin

Po 24 godzinach przebywania na tych pożywkach ścięto część nadziemną i na pieńki założono zbiorniki na sok płaczu. Aby zapobiec działalności mikroorganizmów po 30 minutach do każdego zbiornika z wydzielonym sokiem płaczu, dodano po 2 krople toluolu. Materiał roślinny zabijano w temperaturze 105°C i w tej temperaturze suszono do stałej wagi.

Sucha masa części nadziemnej wynosiła średnio 2,32 g i korzeni 0,71 g. Wykres na ryc. 4 przedstawia wyniki doświadczenia w odniesieniu do dynamiki parcia korzeniowego roślin. Z wykresu wynika, że ilość wydzielonego soku płaczu przez rośliny, które przeniesiono na pożywki azotanowe, jest po 3 godzinach przeszło 4-krotnie, po 12 godzinach przeszło 3,5-krotnie, a po 24 godzinach przeszło 3-krotnie wyższa w porównaniu

Tabela 12 — Table 12

Wpływ aeracji, źródła azotu i Mn na zawartość cukrów rozpuszczalnych i wolnych kwasów organicznych w kukurydzy

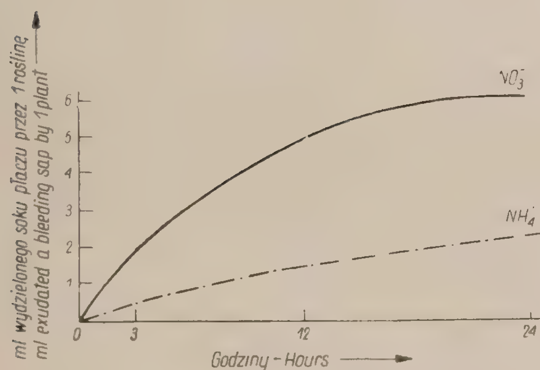
Effect of aeration, nitrogen source and Mn on the soluble carbohydrates and free organic acids content in the maize

	Pożywka Solution	Część nadziemna Tops			Korzenie Roots		
		cukry redukujące w % suchej masy reducing carbohydrates in % dry matter	sacharoza w % suchej masy saccharose in % dry matter	wolne kwasy organiczne w miliekwiwalentach na 100 g suchej masy the free organic acids in miliequivalents on 100 g dry matter	cukry redukujące w % suchej masy reducing carbohydrates in % dry matter	sacharoza w % suchej masy saccharose in % dry matter	wolne kwasy organiczne w miliekwiwalentach na 100 g suchej masy the free organic acids in miliequivalents on 100 g dry matter
Przewietrzane Aerated	NH_4	3,50	1,00	59,1	2,15	0,71	91,4
	NO_3	3,80	2,35	66,2	2,75	0,98	104,6
	NH_4+Mn	4,50	1,09	62,7	4,30	0,10	88,6
	NO_3+Mn	4,90	2,28	64,8	4,80	0,33	95,4
Nie przewietrzane No aerated	NH_4	3,80	1,52	51,7	1,80	0,90	63,2
	NO_3	4,65	1,90	58,0	3,30	0,20	88,7
	NH_4+Mn	5,65	1,70	54,2	2,90	0,13	66,7
	NO_3+Mn	4,95	2,46	57,0	3,80	0,22	83,5

z ilościami soku płaczu wydzielonymi przez rośliny przeniesione na pożywki amonowe.

W roztworze soku płaczu azot azotanowy stwierdzono tylko w kombinacji azotanowej. Po zastosowaniu środka antyseptycznego nie stwierdzono azotanów w soku płaczu roślin z pożywek amonowych w czasie trwania doświadczenia i nawet po 4 dniach, w pozostawionym eksudacie, azotanów nie udało się stwierdzić. Potwierdzono natomiast obniżkę pH soku płaczu, które wynosiło na pożywce amonowej: po 3 godzinach 6,9, po 12 godzinach 6,1, a na pożywce azotanowej: po 3 godzinach 6,7, po 12 godzinach 5,9.

Próby na zawartość w soku płaczu cukrów i białka były we wszystkich wypadkach dodatnie. Największy osad białka po dodaniu etanolu notowano w kombinacji azotanowej. Przeprowadzona analiza chromatograficzna soku płaczu, zebranego po 3 i po 12 godzinach od chwili ścięcia



Ryc. 4. Dynamika parcia korzeniowego kukurydzy
The dynamics of root pressure of a maize plant



Ryc. 5. Całkowita ilość soku płaczu w ml
Total bleeding sap in ml

części nadziemnej roślin, dała analogiczne wyniki jak w poprzednim doświadczeniu (mimo różnicy 1 godziny w tym doświadczeniu). Interesująco wypadły próby na zawartość azotu azotanowego w roztworze guttacyjnym po przeniesieniu roślin na pożywki amonowe i azotanowe. Mianowicie po przeniesieniu roślin na pożywkę azotanową zanotowano wystąpienie guttacji już po 4 godzinach, natomiast u roślin przeniesionych na pożywki amonowe dopiero po 8 godzinach. Próby na zawartość azotu azo-

tanowego i amonowego z roztworem guttacyjnym roślin z pożywek azotanowych były dla obu tych form azotu dodatnimi. Natomiast w roztworze guttacyjnym roślin, które przeniesiono na pożywki amonowe, wykryto tylko azot amonowy, mimo że rankiem tegoż dnia z roztworem guttacyjnym tych roślin (pozostających jeszcze na pożywce NH_4NO_3) stwierdzono także azot azotanowy. Wynik ten świadczy o całkowitej redukcji azotanów pobranych z pożywki azotanowo-amonowej w ciągu 8 godzin po przeniesieniu roślin na pożywki amonowe.

DYSKUSJA

Przedstawione wyniki badań w 4 doświadczeniach tej części pracy wyłoniły szereg zagadnień wymagających oddzielnego omówienia.

1. Zagadnienie wpływu aeracji na wzrost kukurydzy. Zagadnienie to potrakowane zostało w naszych badaniach pod kątem widzenia fizjologicznego działania tego zabiegu na procesy zachodzące w roślinach. Wykazano, że aeracja pożywki powoduje zwiększenie potencjału oksydoredukcyjnego w roślinie i w pożywce (dośw. I), powoduje wzrost zawartości wolnych kwasów organicznych, a zmniejszenie zawartości cukrów rozpuszczalnych w roślinach (dośw. I, II i III). Zależność ta wskazuje na kierunek procesów zachodzących w roślinie pod wpływem tego czynnika: intensyfikacji procesów utleniania. Wykazano, że kukurydza jest rośliną wrażliwą na niedobór tlenu w pożywce, przede wszystkim w pożywce amonowej. Wykazano przy tym (dośw. III), że intensywna, lecz krótkotrwała aeracja pożywki jest jednakowo skuteczna w działaniu jak aeracja ciągła, lecz mniej intensywna. W aspekcie uzyskanych wyników należy ustosunkować się do danych przedstawionych w pracy J. Stabrowskiej (1959) z zastrzeżeniem w odniesieniu do wpływu aeracji na wzrost kukurydzy. W pracy tej autorki dostrzeżono pewne niedociągnięcia metodyczne. Mianowicie autorka podaje następujące ilości soli azotowych na 1 litr pożywki: pożywka azotanowa KNO_3 — 0.689 g/l + + $Ca(NO_3)_2$ — 0,774 g/l, co w przeliczeniu na azot daje 228,6 mgN/l pożywki i pożywka amonowa $(NH_4)_2SO_4$ — 0,942 g/l + $(NH_4)_2HPO_4$ — 0,124 g/l, co daje 226 mgN/l pożywki. Natomiast w następnym zdaniu pisze, że skontrolowano zawartość azotu w pożywkach i w litrze pożywki azotanowej stwierdzono 190,5 mgN/l, a w pożywce amonowej 191.0 mgN/l, a więc o 35—37 mgN/l mniej niż dodano.

W swej pracy autorka, jak się wydaje, uzyskała słaby wzrost kukurydzy we wszystkich doświadczeniach. Pod tym względem interesująco wygląda porównanie wyników doświadczenia J. Stabrowskiej przeprowadzonego 28.V.—18.V.1957 r. z naszym doświadczeniem z 28.V.— 28.I. 1959 r. (dośw. III). Różnica w okresie wegetacji doświadczenia

autorki (7 dni hodowli na piasku + 21 dni na pożywkach) i naszego doświadczenia (7 dni na wodzie destylowanej + 24 dni na pożywkach) wynosiła przeto 3 dni na korzyść naszego doświadczenia. Różnic w pH nie bierzemy pod uwagę (w doświadczeniu autorki 6,6 w naszym 6,0), gdyż nie wykazały one wpływu na wzrost roślin tak w doświadczeniach autorki, jak i naszych. Niżej podajemy porównanie:

	Dane J. Stabrowskiej Tabela 3	Dane nasze Tabela 10
	Ciężar suchej masy 1 rośliny w g	
Pożywka azotanowa		
wietrzona	0,772	4,37
nie wietrzona	0,690	3,53
Pożywka amonowa		
wietrzona	0,612	3,90
nie wietrzona	0,512	1,517

Różnice są bardzo duże, a trzeba jeszcze podkreślić, że dane tej tabeli w odniesieniu do suchej masy kukurydzy są wyższe niż w pozostałych doświadczeniach z kukurydzą przeprowadzonych przez autorkę. W tabeli 5 autorka zestawiła stosunki odpowiednich suchych mas roślin z poszczególnych doświadczeń z kukurydzą. Z tabeli tej wynika, że aeracja pożywki azotanowej właściwie nie wpływa na wzrost roślin (zwyżka suchej masy pod wpływem tego czynnika waha się w granicach 0,3—14%), natomiast w grupie roślin rosnących na pożywkach amonowych tylko w jednym wypadku (doświadczenie 17.V.—6.VI) sucha masa roślin przewyższała o 62% suchą masę roślin z tej pożywki nie wietrzonej. W pozostałych trzech doświadczeniach zwyżka ta wahała się od 0,1 do 20%. Interpretacja wyników przez autorkę jest odmienna od uzyskanych w naszych badaniach. Wydaje się, że przyczyną tego stanu rzeczy było stosowanie przez autorkę odmiennej od naszej metody badań. Zastosowanie małych (0,9 i 1-litrowych) wazonów, w których autorka umieszczała po 4 rośliny, wydaje się, stanowiło najpoważniejszą przyczynę tego stanu rzeczy, a to z następujących względów: stosowana metoda wietrzenia (kilkakrotne przelewanie codziennie pożywki z wazonu do wazonu) albo nie gwarantowała dostatecznego nasycenia tlenem pożywki, albo rośliny w krótkim czasie pobrały rozpuszczony w roztworze tlen. Możliwe, iż jedną z przyczyn mogło być przyrządzenie pożywki na wodzie wodociągowej. Wydaje się, że argument skuteczności takiej metody aeracji pożywki, w odniesieniu np. do pomidorów, nie może chyba być uznany, gdyż cyfry charakteryzujące wzrost pomidorów są również bardzo małe.

2. Zagadnienie roli azotanów względnie soli amonowych jako źródeł azotu dla roślin w warunkach słabego natlenienia podłoża. Wyniki badań D. J. Arnona (1937), który wykazał możliwość kompensacji niedoboru tlenu w pożywce przez azotany, oraz wypowiedziana hipoteza o udziale azotanów w procesach oksydoredukcyjnych w roślinie, w naszych badaniach uzyskała bezpośrednie potwierdzenie. Wykazano, że azotany powodują zwiększenie poziomu E_h w roślinie. Potwierdzono także wyniki badań S. Gumińskiego i współpracowników (1957) o możliwości kompensacji niedoboru tlenu przez azotany. Na możliwość kompensacji niedoboru tlenu przez azotany wskazuje jeszcze jeden argument wynikający z porównania zawartości tlenu w solach pożywki amonowej i azotanowej: w pożywce amonowej ogólna ilość tlenu wynosi 768 mg/l pożywki, natomiast w pożywce azotanowej znajduje się 704 mg/l, w tym tlenu azotanów 96 mg l pożywki. Te stosunki liczbowe charakteryzujące zawartości tlenu w solach pożywki amonowej i azotanowej, przy porównaniu ich skuteczności działania na wzrost i procesy zachodzące w roślinach w warunkach słabego natlenienia podłoża, wskazują, że tlen siarczanów i fosforanów, w przeciwieństwie do azotanów, nie wykazuje właściwości kompensacji niedoboru tlenu w pożywce. W badaniach pobierania azotanów i soli amonowych w warunkach naszego doświadczenia (dośw. II) stwierdzono, że azotany są intensywniej pobierane przez kukurydzę niż azot amonowy. Wykazano przy tym dodatni wpływ aeracji i dodatku do pożywki manganu i miedzi na ten proces, przede wszystkim w odniesieniu do azotu amonowego na pożywkach nie przewietrzanych.

3. Rola mikroelementów w warunkach niedostatecznego natlenienia pożywki. W przedstawionych badaniach w 4 doświadczeniach tej pracy wykazano, że dodanie do pożywki manganu oraz miedzi (dośw. II) powoduje wzrost zawartości w roślinach cukrów rozpuszczalnych. M. J. Szkolnik i S. A. Abduraszitow (1958) wykazali, że mangan zwiększa syntezę i przemieszczanie się monoz i sacharozy oraz zwyżkę aktywności polifenoloksydazy, peroksydazy, askorbinoksydazy i intensywności oddychania u kukurydzy w doświadczeniu polowym. Autorzy tłumaczą te fakty tym, że mangan powoduje zwiększenie intensywności procesów oksydoredukcyjnych zachodzących w roślinie. Objaśnienie to uzyskało potwierdzenie w naszych badaniach. Przy pomocy bezpośrednich pomiarów potencjału oksydoredukcyjnego wykazaliśmy zwiększenie poziomu E_h w roślinie pod wpływem dodatku do pożywki manganu. Wykazano również podwyższenie poziomu rH w pożywce z manganem w porównaniu z pożywkami bez manganu. Być może mechanizm działania manganu w pożywce jest następujący: mangan, jako pierwiastek mający stosunkowo wysoki potencjał oksydoredukcyjny, utlenia

związki zredukowane, sam ulegając redukcji utlenia się z kolei tlenem powietrza. Przypuszczenie to wymaga eksperymentalnego potwierdzenia W doświadczeniu II wykazano stymulujący wpływ manganu i miedzi na pobieranie azotu amonowego w warunkach kultur nie przewietrzanych. W doświadczeniach I, II i III przedstawiono dane świadczące o stymulacyjnym działaniu manganu i miedzi (dośw. II) na wzrost roślin przede wszystkim w warunkach kultur nie przewietrzanych na pożywkach amonowych. Mangan wykazał również dodatni wpływ na parcie korzeniowe kukurydzy.

4. Rola azotanów w aktywnym pobieraniu i przewodzeniu wody przez rośliny była przedmiotem badań licznych fitofizjologów. Wpływ aeracji na ten proces znany jest od dawna i wyczerpująco oświetlony przez różnych autorów (P. J. Kramer 1956, A. S. Crafts, H. B. Currier i C. R. Stocking 1949, i in.) W naszych badaniach szczególnie wyraźny dodatni wpływ aeracji na ten proces przejawił się na pożywkach amonowych. Wpływ tego zabiegu w grupie roślin rosnących na pożywkach azotanowych, chociaż wyraźny, jest mniejszy niż w grupie roślin rosnących na pożywkach amonowych. Wyniki badań przedstawionych w dośw. III wykazały, że azotany stymulują aktywne pobieranie i przewodzenie wody przez rośliny. Wyników tych nie można objaśnić różnicami we wzroście roślin (dośw. III), gdyż np. w kombinacji NH_4 przewietrz. sucha masa korzeni przewyższa nawet suchą masę korzeni na analogicznych pożywkach azotanowych, podczas gdy ilość wydzielonego soku płaczu w jednakowym czasie jest: po 4 godzinach od chwili ścięcia części nadziemnej prawie 2,5-krotnie, a po 12 godzinach 3-krotnie wyższa w grupie roślin z pożywek azotanowych niż amonowych. Wniosek ten potwierdzają wyniki przedstawione w doświadczeniu IV. W odniesieniu do naszych wyników interesujące są dane z pracy F. C. Stewarda, P. R. Stouta i C. Prestona (1940). Wymienieni autorzy wykazali anomalne pochłanianie wody przez krążki z bulwy ziemniaka. Potas powodował zwiększenie intensywności tego procesu, natomiast wapń hamował działanie potasu. Jony azotanowe zwiększały jeszcze dodatnie działanie potasu.

W późniejszych badaniach F. C. Steward i J. K. Pollard (1956) wykazali, że azot w formie NH_4NO_3 w porównaniu z $(NH_4)_2SO_4$ stymuluje pochłanianie tlenu i syntezę białka przez krążki ziemniaka. W świetle tych danych przedstawione w naszych badaniach wyniki prób na zawartość białka w soku płaczu roślin rosnących na pożywkach azotanowych należy chyba rozpatrywać z punktu widzenia zależności procesów aktywnego pobierania i przewodzenia wody przez rośliny z syntezą białka. Zagadnienie to jest przedmiotem odrębnych badań i będzie przedstawione w oddzielnej publikacji.

5. Analizy chromatograficzne składu aminokwasowego soku płaczu roślin (dośw. III i IV) przy zastosowaniu układu rozpuszczalników fenol-bufor fosforanowych o pH 12 nie wykazały wpływu aeracji, źródła azotu i manganu na skład aminokwasowy soku płaczu. Niejasny jest fakt zwiększenia liczby aminokwasów w soku płaczu zebranym po 12 godzinach od chwili ścięcia części nadziemnej. W soku płaczu zebranym po 3 i 4 godzinach od chwili ścięcia części nadziemnej roślin wykryto kwas glutaminowy, alaninę i prawdopodobnie glutaminę, a po 12 godzinach, oprócz związków wymienionych, jeszcze kwas asparaginowy i walinę, a więc podstawowe aminokwasy dla syntezy białka. Wyniki te rozpatrujemy jako orientacyjne, gdyż być może ilości roztworu soku płaczu (50 µl), używanego do analiz, nie zawierały dostatecznej ilości innych aminokwasów wykrywanych metodą chromatografii bibułowej. Być może także zastosowanie innego układu rozpuszczalników i techniki dwukierunkowej pozwoliłoby na rozwiązanie tego zagadnienia. Zagadnienia te są przedmiotem dalszych badań.

STRESZCZENIE

W latach 1958—1959 przeprowadzono badania nad wpływem aeracji, źródła azotu, dodatku do pożywki manganu i miedzi na wzrost, pobieranie azotu i procesy biochemiczne zachodzące w roślinach pod wpływem tych czynników. Rośliną doświadczalną była kukurydza zwyczajna *(Zea mays)*. Badania przeprowadzono w kulturach wodnych przy stałym i kontrolowanym pH pożywki. W wyniku badań wykazano, że kukurydza jest rośliną wrażliwą na niedobór tlenu w pożywce (dośw. I, II i III). Dane te nie zgadzają się z wynikami prac J. Stabrowskiej (1959) oraz S. Gumińskiego i współpracowników (1957). Wykazano, że fizjologiczne działanie aeracji polega na zwiększeniu intensywności procesów oksydoredukcyjnych zachodzących w roślinie. Zabieg ten powoduje zwiększenie zawartości wolnych kwasów organicznych, a zmniejszenie zawartości cukrów rozpuszczalnych w roślinie (dośw. I, II i III). Aeracja powoduje wzrost poziomu E_h w roślinie i rH w pożywce (dośw. I), stymuluje pobieranie azotu amonowego (dośw. II) oraz procesu aktywnego pobierania i przewodzenia wody przez rośliny (dośw. III). Azotany w warunkach słabego natlenienia podłoża kompensują niedobór tlenu w pożywce oraz zwiększają E_h w roślinie i rH pożywki (dośw. I) i w porównaniu z solami amonowymi w warunkach niedoboru tlenu w pożywce stymulują wzrost roślin (dośw. I, II i III). Azotany stymulują aktywne pobieranie i przewodzenie wody przez rośliny (dośw. III). Wykazano, że azot azotanowy przy pH 6,0 w warunkach naszego doświadczenia był intensywniej pobierany przez rośliny niż azot amonowy (dośw. II). W soku płaczu roślin, rosnących na pożywkach azotanowych, po dodaniu etanolu, stwierdzono większy osad białka niż w soku płaczu roślin z pożywek amonowych (dośw. III i IV).

Dodanie do pożywek manganu lub miedzi stymuluje wzrost roślin rosnących na pożywkach amonowych w warunkach słabego natlenienia podłoża.

Działanie tych mikroelementów na wzrost roślin na pożywkach azotanowych tak przewietrzanych jak i nie przewietrzanych, oraz na pożywkach amonowych

przewietrzanych, jest znikome lub nie przejawia się wcale. Mangan i miedź zwiększają intensywność procesów oksydoredukcyjnych i powodują wzrost zawartości cukrów rozpuszczalnych w roślinie (dośw. I, II i III). Wykazano dodatnie działanie manganu na proces aktywnego pobierania i przewodzenia wody przez rośliny (dośw. III). Wykazano, że mangan i miedź stymulują pobieranie azotu amonowego przez rośliny w warunkach niedostatecznego natlenienia podłoża (dośw. II).

W wyniku analiz chromatograficznych na bibule soku płaczu roślin, przeprowadzonych w układzie rozpuszczalników fenol-bufor fosforanowy, o pH 12, nie wykazano wpływu aeracji, źródła azotu i manganu na skład aminokwasowy soku płaczu (dośw. III i IV).

Wskazanie tematu, cenne rady i pomoc w wykonaniu tej pracy zawdzięczam ś.p. Profesorowi Kazimierzowi Bassalikowi, Kierownikowi Katedry Fizjologii Roślin Uniwersytetu Warszawskiego.

Pracowniczce Katedry pani Jadwidze Roskosz składam podziękowanie za wydatną pomoc w technicznym przygotowaniu doświadczeń.

Katedra Fizjologii Roślin
Uniwersytetu Warszawskiego

(Wpłynęło dn. 10.3.1960 r.)

SUMMARY

The influence of aeration, of different nitrogen sources, and of culture solutions enriched with manganese and copper on the growth, nitrogen uptake and biochemical processes occuring in plants under the influence of these factors were investigated in the years 1958—59. Maize (*Zea mays* L.) was used for the experiments. Investigations were made in water cultures under constant check on the pH of culture solutions. It has been shown that maize is sensitive to shortage of oxygen in culture solutions (experiments I, II, III). These data do not agree with the results obtained by J. Stabrowska (1959) and S. Gumiński with collaborators (1957). It has been shown that the physiological effect of aeration consists in an increased intensity of oxidation-reducing processes occuring in the plants. Aeration increases also the content of free organic acids and decreases soluble carbohydrates content in the plants (experiments I, II III). Aeration raises the E_h level in the plant and the rH of culture solution (experiment I), stimulates the uptake of ammonium nitrogen, as well as the process of active uptake and movement of water in the plants (experiments III, IV). In conditions of low oxygen level in the nutrient solution nitrates compensate oxygen deficit in the culture solution and raise the E_h in the plant and the rH in the culture solution (experiment I) and in comparison with ammonium salts in culture solutions with oxygen deficit, they stimulate plant growth (experiments I, II, III). Nitrates stimulate an active uptake and movement of water by plants (experiment III). It has been shown that nitrate nitrogen in our experiment (by pH 6) was more intensively used by the plants, than ammonium nitrogen (experiment II).

In the bleeding sap of plants growing on nitrate culture solutions a greater protein sediment was found after ethanol had been added that in bleeding sap of plants grown on ammonium culture solutions (experiments III, IV).

Manganese or copper added to culture solutions stimulate the growth of plants on ammonium culture solutions with oxygen deficit. The effect of these microelements on plant growth on nitrate culture solutions both aerated and not aerated is insignificant or altogether incouspicuous. Manganese and cooper increase the intensity of oxidation-reducing processes and increase soluble carbohydrates content in plants (experiments I, II, III). It was demonstrated that manganese increases the active uptake and movement of water by plant (experiment III). Copper and manganese stimulate ammonium nitrogen uptake by plants in culture media with oxygen deficit (experiment II).

Chromatographic analyses of the bleeding sap of plants made in the phenol--buffer phosphate with pH 12 solvent system have not shown any influence of aeration, nitrogen source and manganese on the amino acids constitution of bleeding sap.

LITERATURA

Allport N. L., 1947, Colorimetric Analysis, Champman Hall. Ldt., London.

Arnon D. J., 1937, Ammonium and nitrate nitrogen nutrition of barley at different season in relation to hydrogen-ion concentration, manganese, copper and oxygen supply, Soil Sci. 44: 91—121.

Arnon D. J., 1939, Effect of ammonium and nitrate nitrogen on mineral composition and sap characteristics of barley, Soil Sci. 48: 295—307.

Arnon D. J., Fratzke W. E. and Johnson C. M., 1942, Influence of hydrogenion concentration in relation to absorption of inorganic nutrients by higher plants, Plant Physiol. 17: 525—539.

Arrington L. B. and Shive J. W., 1935, Rates of absorption of ammonium and nitrate nitrogen from culture solutions by ten-day-old tomato seedlings at two pH levels, Soil Sci. 39: 431—435.

Becking J. A., 1956, On the mechanism of ammonium ion uptake by maize roots, Acta bot. neerl. 5. (1): 1—79.

Bojczenko E. A., Zacharowa N. I., 1959, Żelezo i marganiec w reakcjach fotosynteza, Fizjołogia rastieni 6. wyp. 1: 88—91.

Bongers L. H. J., 1956, Aspects of nitrogen assimilation by cultures of green algae. Mededelingen van de Landbouwhogeschool te Wageningen. Nederland. 56 (15): 1—52.

Bossingault J. B., 1957, Izbrannyje proizwiedienia po fizjołogii rastieni i agrochimii, Sielchozizdat, Moskwa (Tłumaczenie ros. z franc.).

Burström H., 1939, Über die Schwermetallakatalyse der Nitrat-Assimilation, Planta 29: 292—305.

Chibnall A. C., 1939, Metabolizm białek w roślinie (Tłum. polskie z ang.), P. W. R. i L., Warszawa 1952.

Clark H. E. and Shive J. W., 1934, The influence of the pH of culture solution on the rates of absorption of ammonium and nitrate by the tomato plant, Soil Sci. 37: 203—225.

Crafts A. S., Currier H. B., Stocking C. R., 1949, Water in the physiology of plants, Chronica Botanica Co, Walthman, Mass.

Eyster C., Brown T. E., Tanner H. A., Hood L. S., 1958, Manganese requirement with respect to growth, Hill reaction and photosynthesis. Plant Physiol. 33: 235—241.

Górski M., 1929, O fizjologicznej reakcji soli, Roczn. Nauk. Roln. 22: 27.

Gumiński S., Czerwiński W., Unger E. Skrabka H. 1957, Badania nad oddychaniem korzeni. Część II. (Wpływ niektórych związków mineralnych), Acta Soc. Bot. Pol. 26: 631—645.

Haas A. R. C., 1940, The importance of root aeration in avocado and citrus trees, Calif. Avocado Assoc. Year Book. 77—84.

Hoagland D. R., Broyer T. C., 1936, General nature of the process of salt accumulation by roots with description of experimental methods, Plant Physiol. 11: 471—507.

Hoagland D. R. and Arnon D. J., 1941, Physiological aspects of nutrients for plant growth, Soil Sci. 51: 431—444.

Jermakow A. N., Arasimowicz M. J., Smirnowa-Ikonnikowa M. I., Murri I. K., 1952, Mietody biochimiczeskogo analiza rastieni, Sielchozgiz, Moskwa.

Knop W., 1860, Landwirtsch. Vers. Sta. 2: 65—99, 270—293.

Kramer P. J., 1956, The uptake of water by plant cells. Handbuch Der Pflanzenphysiologie, 316—334, Band II.

Landegardh H., 1939, Mangan als Katalysator der Pflenzenatmung, Planta 29: 419—426.

Lundegardh H., 1947, Mineral nutrition of plants. Ann. Rev. Biochem. 16: 503—528.

McCalla A. G. and Woodford E. K., 1938, Effect of a limiting element of the absorption of individual elements and on the anion: cation balance in wheat, Plant Physiol. 13: 695—712.

MacFarren E. F., Mills J. A., 1952, Anal. Chem. 24: 650.

Maksimow A., 1929, Studja nad fizjologiczną reakcją soli amonowych i azotanów, Roczn. Nauk. Roln. i Leśn. 22: 33.

Naftel J. A., 1931, The absorption of ammonia and nitrate nitrogen by various plants at different stages of growth, J. Amer. Soc. Agronom. 23: 142—158.

Nightingale G. T. and Schermerhorn L. G., 1928, Nitrate assimilation by asparagus in the absence of light, J. N. Agricult. Exper. Stat. Bull. 476.

Nightingale G. T., 1942, Potassium and phosphate nutrition of pineapple in relation to nitrate and carbohydrate reserves, Bot. Gaz. 104: 191—223.

Niklewski B. i Wojciechowski J., 1938, Wpływ związków próchnicznych na pobieranie fosforanu amonu $(NH_4)_2HPO_4$ i siarczanu amonu $(NH_4)_2SO_4$ przez rośliny, Acta Soc. Bot. Pol. 15: 111—151.

Olsen C., 1950, The significance of concentration for the rate of ion absorption in higher plants in water culture, Physiol. Plant. 3: 152—165.

Omielanskij W. L., 1940, Prakticzeskoje rukowodstwo po mikrobiołogii, Izdat. AN SSSR, 416—419.

Patrick W. H., J. R. and M. B. Sturgis, 1955, Concentration and movement of oxygen as related to absorption of ammonium and nitrate nitrogen by rice, Soil Sci. Soc. Am. Proc. 19: 59—62.

Pirschle K., 1929, Nitrate und Ammonsalze als Stickstoffquellen für höhere Pflanzen bei konstanter Wasserstoffionenkonzentration. IV, Z. Pflanzenernährg, Düng. u. Bodenkde 22: 51—86.

Prianisznikow D. N., 1951, Izbrannyje Soczinienia, Izdat. AN SSRR. Moskwa.

Prevot P., Steward F. C., 1936, Salient features of root system relative to the problem of salt absorption, Plant Physiol. 11: 509—534.

Rautenberg F., Kühn G., 1864, Landwirtsch. Vers. Sta. 6: 355—359.

Sabinin D. A., 1955, Fizjołogiczeskije osnowy pitania rastieni, Izdat. AN SSSR. 424—427, Moskwa.

Sachs J., 1860, Landwirtsch. Vers. Sta. 2. 22—31, 219—268.
Shive J. W., 1934, Nitrogen absorption and aeration, N. J. Agricult. 16: 2—3.
Sideris C. P., a. Young H. Y., 1946, Effects of potassium on the nitrogenous constituents of *Ananas comosus* (L.) Merr., Plant. Physiol. 21: 218—232.
Stahl A. L., a. Shive J. W., 1934, Studies on nitrogen absorption from culture solutions. I. Oats. Soil Sci. 35: 375—399.
Steward F. C., 1933. The absorption and accumulation of solutes by living plant cells. V. Observations upon the effect of time, oxygen and salt concentration upon absorption and respiration by storage tissue, Protoplasma. 18: 208—242.
Steward F. C., Stout P. R., Preston C., 1940, The balance sheet of metabolites for potato discs showing the effect of salts and dissolved oxygen of metabolism at 23°C, Plant Physiol. 15: 409—447.
Steward F. C., Pollard J. K., 1956, Some further observations on glutamyl and related compounds in plants. A Symposium Inorganic Nitrogen Metabolism, Baltimore, The Johns Hopkins Press.
Stabrowska J., 1959, Wzrost roślin na azotanach lub solach amonowych w zależności od stopnia natlenienia podłoża, Acta Soc. Bot. Pol. 28: 589—620.
Strebeyko P., 1932, Wpływ temperatury na fizjologiczną reakcję azotanu amonowego, Roczn. Nauk. Roln. Leśn. 28: 1—14.
Szkolnik M. J., Abduraszitow S. A., 1958, Wlijanije mikroelementow na syntez i pieredwiżenie uglewodow, Fizjołogia rastieni. 5. wyp. 5: 393—399.
Tiedjens V. A. a. Robbins W. R., 1931, The use of ammonia and nitrate nitrogen by certain crop plants, N. J. Agricult. Exper. Stat. Bull. 526.
Trelease S. F. a. Trelease H. M., 1933, Physiologically balanced culture solutions with stable hydrogen-ion concentration, Science 78: 438.
Taylor D. L., 1942, Influence of oxygen tension on respiration, fermentation and growth in wheat and rice, Am. J. Bot. 29: 721—738.
Warburg O., Negelein E., 1920, Über die Reduktion der Salpetesäure in grünen Zellen, Biochem. Z. 110: 66—115.

ACTA SOCIETATIS
BOTANICORUM POLONIAE
Vol. XXX — Nr 2
1961

Nowe aspekty roli azotanów względnie soli amonowych jako źródeł azotu dla roślin. Część II

New aspects on the role of nitrates or ammonium salts as nitrogen sources for plants. Part II.

J. POSKUTA

WSTĘP

G. N. Hoffer i B. A. Krantz (1957) podają, że kukurydza wymaga zaopatrzenia w azot w ciągu całego okresu wegetacji, jednakże najwięcej zużywa azotu w okresie dwóch tygodni przed wykłoszeniem i trzech tygodni po wykłoszeniu. Kukurydza jest bardzo wrażliwa na niedobór azotu w podłożu i stanowi pewnego rodzaju wskaźnik niedostatecznego zaopatrzenia podłoża w związki azotowe. Aby przekonać się, jak zareagują rośliny na dodanie azotu po długotrwałym głodzie azotowym, wykonano serię doświadczeń w latach 1958—1959. A priori, po długotrwałym głodzie azotowym nie można było przewidzieć, czy roślina w ogóle zdolna będzie pobrać azot w podanych ilościach, a jeżeli tak, to w jakim stopniu i jak roślina zareaguje na ten zabieg oraz jak wpłynie to na wzrost i rozwój roślin.

BADANIA WŁASNE

DOŚWIADCZENIE I

Nasiona kukurydzy kiełkowano 5.V.1958 r. na wodzie wodociągowej. Po wykiełkowaniu rośliny rosły w szklarni w ciągu 24 dni w zlewkach również na wodzie wodociągowej. 29.V wybrano siewki i po odcięciu nasion przeniesiono na pożywki bez azotu do 4,5-litrowych słojów umieszczając po 1 roślinie w słoju. Siewki miały 3 liście. Skład pożywki w molach na litr przedstawiał się następująco: $MgSO_4$ — 0,003, $Ca(H_2PO_4)_2$ — 0,0015, K_2SO_4 — 0,001, KH_2PO_4 — 0,001 oraz 10 ml 0,5% roztworu cytrynianu żelaza i 4 ml roztworu mikroelementów A — Z, wg D. R. Hoaglanda w modyfikacji K. Bassalika na 4 litry po-

żywki. pH pożywki ustalono na 6,2 i utrzymywano na stałym poziomie w czasie trwania doświadczenia (sposób opisany w I części pracy). Nastawiono 8 słojów, które umieszczono na wózku w hali wegetacyjnej.

Przebieg wegetacji roślin do chwili dodania azotu do pożywki

W chwili przeniesienia na pożywki bezazotowe rośliny miały już lekko zabarwione antocjanami łodygi, jednakże liście były zupełnie zielone. Po umieszczeniu roślin w słojach na pożywkach bezazotowych już po tygodniu pojawił się nowy mocno wypłoniony liść. Po 14 dniach 2 dolne liście, które były zabarwione na kolor brunatny, stały się żółte i suche. Pojawiający się co 6—7 dni nowy liść osiągał niewielkie rozmiary i był bladozielony. Liście dolnych pięter miały barwę brunatną, żółkły i zasychały. Pojawiające się nowe liście świadczyły o odbywającym się rozwoju tych roślin, mimo że wzrost ich był znikomy, oraz o przemieszczaniu się zapasów azotu pobranych przez rośliny tylko z nasion przed ich usunięciem z liści starszych do młodych. Korzenie tych roślin były długie, bardzo cienkie i w górnych partiach lekko zabarwione antocjanami.

Reakcja roślin na dodanie azotu po 50 i 60 dniach wegetacji na pożywce bez azotu

Do wazonów (I seria), po 50 dniach wegetacji roślin na pożywce bez N (24 dni na wodzie wodociągowej + 26 dni na pożywce bez N), dodano azot w formie $Ca(NO_3)_2$ do 2 wazonów po 28 mg N (1 pożywki i do pozostałych 2 wazonów po 56 mg N 1 pożywki w roztworze po 20 ml na wazon. W chwili dodania azotu do pożywki rośliny miały po 9 liści, z których tylko 1 górny liść był bladozielony. Następne 2 liście miały barwę brunatnoczerwoną, pozostałe liście były żółte i suche. Azot dodano 23.VI o godzinie 11^{00}, temperatura powietrza wynosiła 22°C, względna wilgotność powietrza nad roślinami wynosiła 90%. Już po 3 godzinach od chwili dodania azotu do pożywki zaobserwowano obfitą guttację na nie wyschniętych liściach kukurydzy we wszystkich wazonach, do których dodano azot. Wynik był tak nieoczekiwany, że rośliny poddano szczegółowej obserwacji, przy czym kontrolnymi były rośliny, które azotu nie otrzymały. Aby przekonać się, czy w roztworze guttacyjnym znajduje się azot, wykonano próby na azotany z dwufenyloaminą w stężonym kwasie siarkowym oraz próby na azot amonowy z odczynnikiem Nesslera. Próba z dwufenyloaminą była dodatnia, z odczynnikiem Nesslera ujemna. Występująca guttacja była tak obfita, że utrzymywała się w ciągu całego dnia,

mimo że względna wilgotność powietrza obniżyła się np. o godzinie 17^{30} do 50%. Guttację stwierdzono następnego ranka chociaż już mniej obfitą i proces ten zachodził aż do 14 lipca, przy czym krople roztworu guttacyjnego utrzymywały się dłużej na liściach w dni pochmurne, chociaż guttacja była intensywniejsza w dni słoneczne. Po kilku dniach obserwowano, że pierwszy liść stał się bardziej zielony, zazieleniały się również liście będące dotąd barwy brunatnoczerwonej. Pojawiający się młody liść był już zupełnie zielony. 2.VII do 2 wazonów dodano po 28 mg N/l pożywki i do następnych 2 po 56 mg N/l w formie $Ca(NO_3)_2$ (II seria). W tej serii rośliny wegetowały na pożywkach bez N w ciągu 60 dni (24 dni na wodzie wodociągowej + 36 dni na pożywce bez N). Azot dodano o godzinie 12^{00}, temperatura powietrza wynosiła 26°C, względna wilgotność powietrza 60%. Rośliny poddano szczegółowej obserwacji i po upływie $7^1/_2$ godzin stwierdzono pojawianie się kropel roztworu guttacyjnego na nie wyschniętych liściach roślin. W tym czasie temperatura w hali wegetacyjnej wynosiła 21°C, a względna wilgotność powietrza 73%. Następnego ranka, i aż do 14 lipca, obserwowano występowanie na liściach tych roślin kropel roztworu guttacyjnego. Jednakże po tygodniu od chwili dodania azotu do pożywki intensywność guttacji znacznie osłabła. 14.VII rośliny I serii wykłosiły się we wszystkich wazonach. 16.VII wykłosiły się rośliny II serii. 21.VII zakwitły rośliny I serii, które otrzymały 28,0 mg N/l pożywki. 24.VIII zakwitły rośliny tejże serii, które otrzymały 56,0 mg N/l pożywki. Tegoż dnia zakwitły rośliny II serii, które otrzymały 28,0 mg N/l pożywki Trzeba zaznaczyć, że rośliny II serii, które otrzymały 56,0 mg N/l pożywki, w ogóle nie zakwitły, guttacja obfita po dodaniu azotu do pożywki już po tygodniu ustała, pojawiła się natomiast silna chloroza, która nie ustąpiła aż do likwidacji doświadczenia. 31.VII doświadczenie zlikwidowano. Oddzielono część nadziemną od korzeni i materiał roślinny zabijano w temperaturze 105°C w ciągu 30 minut, po czym suszono w temperaturze 70—75°C w suszarce elektrycznej w ciągu 30 godzin. W materiale roślinnym oznaczono azot wg Kjeldahla. Tabela 1 przedstawia wyniki doświadczenia. Doświadczenie wykazało, że kukurydza, która rosła na pożywce bez N, w ciągu 50 dni zasymilowała ok. 60% dodanego N do pożywki. Rośliny przy tym intensywnie rosły, wykłosiły się i zakwitły. Rośliny rosnące na pożywce bez N w ciągu 60 dni, po dodaniu do pożywki azotu w ilości 28,0 mg N/l, wykazały również dobry wzrost, aczkolwiek sucha ich masa jest mniejsza i niższy procent zasymilowanego N.

Najgorzej rosły i procentowo najmniej pobrały N rośliny, które hodowano na pożywkach bez N w ciągu 60 dni, po czym dodano 56,0 mg N/l pożywki.

Tabela 1 — Table 1

Asymilacja azotu po 50 i 60 dniach głodu azotowego

Nitrogen assimilation by maize after 50 and 60 days of nitrogen starvation

Dodano 28 mg N/l w formie $Ca(NO_3)_2$ Added 28 mg N/l in form of $Ca(NO_3)_2$	Nr rośliny No. plant	Część nadziemna Tops		Korzenie Roots		Całkowity N w mg Total N in mg	% pobranego N % N uptake
		sucha masa w g dry matter in g	mg N na 1 g suchej masy mg N on 1 g dry matter	sucha masa w g dry matter in g	mg N na 1 g suchej masy mg N on 1 g dry matter		
Seria 1	1	5,82	9,60	1,45	7,90	67,33	50,60
Serire I	2	6,02	10,15	1,59	8,60	74,80	66,70
Seria II	1	5,05	8,61	1,61	7,00	54,75	48,80
Serie II	2	4,88	8,54	1,49	6,60	51,50	45,90
Dodano 56 mg N/l Added 56 mg N/l							
Seria I	1	6,36	18,47	2,01	10,15	137,87	61,60
Serie I	2	6,59	17,18	2,34	11,56	141,26	63,10
Seria II	1	1,82	14,10	0,79	11,40	34,70	15,50
Serie II	2	1,72	13,10	0,72	10,70	30,30	13,50

Seria I — po 50 dniach głodu azotowego.
Seria I — after 50 days nitrogen starvation.
Seria II — po 60 dniach głodu azotowego.
Serie II — after 60 days nitrogen starvation.

DOŚWIADCZENIE II

Z doświadczenia 1 wyłoniły się pytania:

1 czy rośliny kukurydzy zdolne będą do asymilowania azotu po przedłużeniu okresu wegetacji na pożywce bez N, np. do 10 tygodni,

2) czy forma azotu mineralnego okaże wpływ na asymilację azotu z pożywki oraz na guttację roślin.

2.VII.1958 r. kiełkowano nasiona kukurydzy na wodzie destylowanej i 15.VII wyrośnięte siewki, po odcięciu nasion, przeniesiono na pożywki bez N o analogicznym składzie, jak w doświadczeniu I. Użyto 2-litrowych słojów szklanych i w każdym słoju umieszczono po 2 rośliny. Stosowano 3-krotne powtórzenia. pH 6,2 utrzymywano na stałym poziomie w okresie wegetacji. Ustalono następujące kombinacje:

Grupa A. azot dodano w formie $Ca(NO_3)_2$
 1) dodano 28 mg N/l,
 2) dodano 56 mg N/l.

Grupa B. azot dodano w formie $(NH_4)_2SO_4$
 1) dodano 28 mg N/l,
 2) dodano 56 mg N/l.

Grupa C. azot dodano w formie NH_4NO_3
 1) dodano 28 mg N/l,
 2) dodano 56 mg N/l.

W dniu przeniesienia roślin na pożywki bez N siewki miały 2 liście. Stosunkowo wysoka temperatura lipca była sprzyjająca dla roślin. Już 24.VII rośliny miały po 5 liści, chociaż wzrost ich był znikomy. Objawy niedoboru azotu widoczne były bardzo wyraźnie. Młode liście były bladozielone i małych rozmiarów, starsze liście żółkły i wysychały, łodyga była intensywnie zabarwiona antocjanami. Zabarwione były także górne partie systemu korzeniowego, który był bardzo cienki i wydłużony. Po 74 dniach wegetacji na pożywkach bez N rośliny miały po 12 liści, z których tylko najmłodszy miał barwę bladozieloną, a drugi z kolei brunatnoczerwoną. Pozostałe liście były żółtobrunatne i suche.

Reakcja roślin na dodanie azotu do pożywki

13.IX o godzinie 9^{00}, przy temperaturze 12°C i względnej wilgotności powietrza 75%, dodano azot w roztworze po 20 ml na wazon w podanych wyżej formach i ilościach. Prowadząc obserwacje tego dnia, aż do północy, nie zauważono guttacji u roślin. Dopiero następnego ranka o godzinie 6^{30} stwierdzono guttację u wszystkich roślin. Orientacyjnie oceniając intensywność guttacji stwierdzono, iż najbardziej obficie proces ten występował na roślinach, którym dodano azot w formie azotanowej, następnie

w formie azotanowo-amonowej. Najmniej guttowały rośliny, którym dodano azot w formie amonowej. Temperatura w hali wegetacyjnej wynosiła wtedy 8°C i względna wilgotność powietrza 90%. Próby na azotany wypadły dodatnio z roztworem guttacyjnym roślin, którym dodano azot w formie azotanowej i azotanowo-amonowej. Próby z odczynnikiem Nesslera wypadły dodatnio z roztworem guttacyjnym roślin, które otrzymały azot w formie amonowej i azotanowo-amonowej. Trzeba zaznaczyć, że krople roztworu guttacyjnego były największe na najmłodszym bladozielonym liściu, na jego wierzchołku, a także na brzegu, natomiast na następnym liściu krople roztworu guttacyjnego były największe na brzegu liścia. Następnie guttację stwierdzano codziennie rano aż do 20.IX, lecz krople roztworu guttacyjnego pojawiają się tylko na młodym liściu, który wyraźnie zazielenił się, lekko również zazielenił się następny liść będący dotąd barwy brunatnoczerwonej.

Po tygodniu od dnia dodania azotu do pożywki guttacja występowała tylko u pojedynczych roślin i po 1.X guttacja już w ogóle nie wystąpiła. W okresie 6.X — 9.X wykłosiły się rośliny we wszystkich wazonach, kłosy były jednak bardzo małe i chlorotyczne. 23.X doświadczenie zakończono. W czasie od dodania azotu do końca doświadczenia rośliny wypuściły jeszcze po 2—3 liście, jednakże bladozielone i małych rozmiarów. System korzeniowy o barwie szarej po dodaniu azotu stał się jaśniejszy oraz pojawiły się nieliczne młode korzenie. Słaby wzrost roślin w porównaniu ze wzrostem roślin w doświadczeniu I należy przypisać prawdopodobnie zbyt niskiej temperaturze (4—14°C), która panowała w hali wegetacyjnej, oraz słabej insolacji w czasie wegetacji po dodaniu azotu. Z materiałem roślinnym postępowano jak w doświadczeniu 1. Tabela 2 przedstawia wyniki doświadczenia. Z tabeli wynika, że sucha masa roślin części nadziemnej i korzeni nie wykazuje istotnych różnic zarówno w odniesieniu do źródła azotu, jak i jego dawki. Zawartość azotu w 1 g suchej masy roślin nie wykazuje widocznych wahań w stosowanych kombinacjach. Zwraca uwagę jednakże to, że zawartość azotu w korzeniach była stosunkowo nieco wyższa niż w części nadziemnej z wyjątkiem kombinacji amonowej przy dawce 28 mg N/l pożywki. Ilość pobranego azotu z pożywki, wyrażona w procentach, nie różni się w zasadzie w odniesieniu do formy azotu, lecz jest prawie o 50% wyższa przy dawce 28 mg N/l niż przy dawce 56 mg N/l pożywki. Doświadczenie wykazało, że rośliny kukurydzy po 74 dniach głodu azotowego, po dodaniu do pożywki azotu w formach stosowanych w doświadczeniu, zasymilowały znaczne ilości podanego N, bo ok. 30 mg, co czyni w przypadku gdy do pożywki dodano 28 mg N/l ok. 50% dodanego do pożywki N, a przy dawce 56 mg N/l ok. 25%. Potwierdzono wynik doświadczenia 1, iż po dodaniu N do pożywki wystąpiła u roślin guttacja.

Tabela 2 — Table 2

Asymilacja azotu przez kukurydzę po 74 dniach głodu azotowego

Nitrogen assimilation by maize after 74 days N- starvasion

Dodano N w formie: Added N in form of	mg N/l	Część nadziemna Tops		Korzenie Roots		Całkowity azot z 2 roślin w mg Total nitrogen in 2 plants in mg	% pobranego azotu z pożywki przez 2 rośliny w mg % nitrogen uptake in culture solution by 2 plants
		sucha masa z wazonu w g dry matter on pot in g	mg N na 1 g suchej masy mg N on 1 g dry matter	sucha masa z wazonu w g dry matter on pot in g	mg N na 1 g suchej masy mg N on 1 g dry matter		
$Ca(NO_3)_2$	56	1,366	15,6	0,583	16,2	30,75	27,90
	28	1,233	15,5	0,573	18,7	29,82	53,25
$(NH_4)_2SO_4$	56	1,300	14,9	0,606	15,3	28,64	25,80
	28	1,183	15,3	0,573	15,0	26,90	47,70
NH_4NO_3	56	1,266	16,8	0,573	17,7	31,30	27,90
	28	1,206	14,8	0,566	18,0	28,00	51,90

DOŚWIADCZENIE III i IV

Dalsze badania nad asymilacją azotu przez rośliny kukurydzy po różnych okresach głodu azotowego

Poprzednie doświadczenia nad asymilacją azotu przez rośliny po różnych okresach głodu azotowego dały interesujące wyniki i stanowiły bodziec do prowadzenia dalszych badań w tym kierunku.

Zastanawiający był fakt, że kukurydza, która w warunkach niedostatecznego natlenienia podłoża lepiej rośnie na azotanach (wyniki I części pracy). W doświadczeniu II, tej II części pracy nie uzyskano różnic we wzroście roślin na pożywkach z azotem azotanowym lub amonowym. Fakt ten należało tłumaczyć tym, iż:

1) po długotrwałym głodzie azotowym rośliny nie reagują na formę dodanego do pożywek azotu,

2) warunki wegetacji roślin były nie sprzyjające (zbyt niska temperatura i słaba insolacja po dodaniu azotu).

Interesowało nas zagadnienie, w jakim stopniu głód azotowy roślin odbije się na zawartości w nich cukrów rozpuszczalnych i wolnych kwasów organicznych.

28.IV.1959 r. kiełkowano nasiona kukurydzy na wodzie destylowanej i po tygodniu, po odcięciu nasion, siewki przeniesiono na pożywki bez N do słojów dwulitrowych. Skład pożywki był analogiczny do podanego w doświadczeniu I. W czasie doświadczenia na stałym poziomie utrzymywano pH = 6,0. Po miesiącu wegetacji doświadczenie zakończono. Z materiałem roślinnym postępowano analogicznie jak w doświadczeniu 1. Cukry rozpuszczalne i wolne kwasy organiczne oznaczano wg metod podanych w doświadczeniu I, I części pracy. Stosowano 10-krotne powtórzenia. Tabela 3 podaje wyniki doświadczenia. Z tabeli można odczytać, że nieobecność azotu w pożywce jest przyczyną bardzo silnego zahamowania wzrostu roślin. Interesujący jest stosunek suchej masy części nadziemnej do korzeni równy prawie 1. Analizy zawartości cukrów rozpuszczalnych i wolnych kwasów organicznych wykazały większą zawartość tych substancji w części nadziemnej niż w korzeniach. Zwraca uwagę stosunkowo wysoka zawartość wolnych kwasów organicznych w tych roślinach.

DOŚWIADCZENIE IV

28.IV.1959 r. kiełkowano rośliny kukurydzy na wodzie destylowanej i po tygodniu po odcięciu nasion przeniesiono na pożywki bez N. Powtórzenia 6-krotne. Pozostała procedura metodyczna jest analogiczna do sto-

Tabela 3 — Table 3

Zawartość cukrów rozpuszczalnych i wolnych kwasów organicznych w kukurydzy po 30 dniach głodu azotowego

Soluble carbohydrates and free organic acids content in maize after 30 days of nitrogen starvation

Część nadziemna — Tops				Korzenie — Roots			
sucha masa 1 rośliny w g dry matter 1 plant in g	cukry redukujące w % suchej masy reducing carbohydrates in % dry matter	sacharoza w % suchej masy saccharose in % dry matter	wolne kwasy organiczne w miliekwiwalentach na 100 g suchej masy the free organic acids in miliequivalents on 100 g dry matter	cukry redukujące w % suchej masy reducing carbohydrates in % dry matter	sacharoza w % suchej masy saccharose in % dry matter	wolne kwasy organiczne w miliekwiwalentach na 100 g suchej masy the free organic acids in miliequivalents on 100 g dry matter	sucha masa w g dry matter in g
0,25	1,66	1,17	100,6	1,06	0,46	74,75	0,24

sowanej w doświadczeniu I. Po miesiącu wegetacji na pożywkach bez N dodano do pożywek azot w następujących formach i ilościach:

a) $(NH_4)_2SO_4$ — 112 mg N na wazon,
b) $Ca(No_3)_2$ — 112 mg N na wazon,
c) $(NH_4)_2SO_4$ — 56 mg N na wazon + 56 mg N po 2 tygodniach,
d) $Ca(NO_3)_2$ — 56 mg N na wazon + 56 mg N po 2 tygodniach.

Pobieranie azotu przez kukurydzę oznaczano wg metod podanych w doświadczeniu II, I części pracy. W dwóch ostatnich przypadkach (punkt c i d), po 6 tygodniach wegetacji roślin, dodano do pożywek nową dawkę azotu, ponieważ okazało się, że po tym czasie rośliny całkowicie pobrały wniesiony azot do pożywek. 29.VI rośliny sfotografowano, oddzielono część nadziemną od korzeni i z materiałem roślinnym postępowano jak w doświadczeniu I.

Tabela 4 i fotografie przedstawiają wyniki doświadczenia. Z tabeli widzimy, że sucha masa roślin, którym dodano azot w formie azotanowej, 2-krotnie przewyższa tę wartość dla roślin, którym dodano azot w formie



Ryc. 1. Doświadczenie IV. Wzrost kukurydzy na azotanach, względnie solach amonowych po 30 dniach głodu azotowego. Wazony: *1, 2, 3* — azot dodano w formie $(NH_4)_2SO_4$; wazony: *39, 40, 41* — azot dodano w formie $Ca(NO_3)_2$
Experiment IV. Growth of maize plants on nitrate or ammonium salts after 30 days nitrogen starvation. Pots: *1, 2, 3* — nitrogen added in $(NH_4)_2SO_4$ form pots: *39, 40, 41* — nitrogen added in $Ca(NO_3)_2$ form

amonowej. Ilość pobranego azotu azotanów jest o ok. 30% wyższa niż azotu amonowego. Zawartość w roślinach cukrów rozpuszczalnych jest wyraźnie wyższa w kombinacji amonowej w stosunku do azotanowej. Zawartość wolnych kwasów organicznych nie wykazuje prawidłowości

Tabela 4 — Table 4

Asymilacja azotu przez kukurydzę po 30 dniach głodu azotowego
Nitrogen assimilation by maize after 30 days of N- starvation

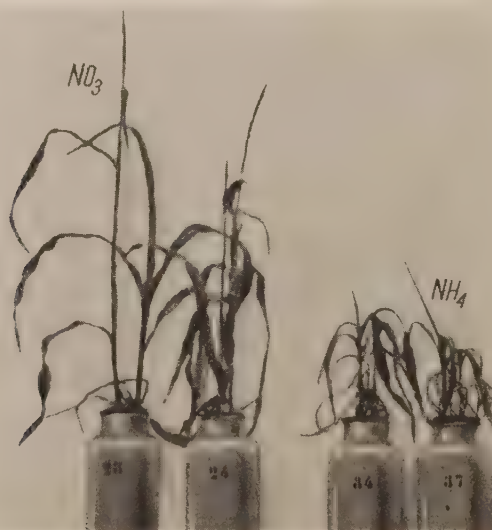
mg N na wazon w formie: mg N on pot in form	Część nadziemna Tops					Korzenie Roots			
	sucha masa z wazonu w g dry matter on pot in g	pobranego N z wazonu w mg mg N uptake in pot	cukry redukujące w % suchej masy reducing carbohydrates in % dry matter	sacharoza w % suchej masy saccharose in % dry matter	wolne kwasy organiczne w miliekwiwalentach na 100 g suchej masy the free organic acids in mili-equivalents on 100 g dry matter	sucha masa z wazonu w g dry matter on pot in g	cukry redukujące w % suchej masy reducing carbohydrates in % dry matter	sacharoza w % suchej masy saccharose in % dry matter	wolne kwasy organiczne w miliekwiwalentach na 100 g suchej masy the free organic acids in mili-equivalents on 100 g dry matter
NH_4 112	1,50	70	4,15	0,61	57,5	0,66	3,05	0,33	51,7
NO_3 112	3,50	101	2,65	0,33	56,5	1,10	2,50	0,14	46,0
NH_4 56+56	1,60	73	4,58	0,39	52,7	0,65	2,90	0,08	45,0
NO_3 56+56	3,20	94	2,39	0,14	51,7	1,20	2,60	0,01	44,5

w odniesieniu do tego czynnika. Porównanie tych danych z wynikami tabeli 3 poprzedniego doświadczenia wykazuje, że dodanie azotu powoduje przede wszystkim silny wzrost roślin po wniesieniu do pożywki azotu azotanowego. Stosunek suchej masy części nadziemnej do korzeni, wynoszący w poprzednim doświadczeniu prawie 1, obecnie ulega 3-krotnemu zwiększeniu. Po dodaniu do pożywki azotu zwiększa się w roślinach zawartość cukrów rozpuszczalnych, zmniejsza się natomiast zawartość wolnych kwasów organicznych.

DOŚWIADCZENIE V

Celem doświadczenia było sprawdzenie wpływu azotu w formie amonowej i azotanowej na wzrost roślin po 74-dniowym głodzie azotowym jako powtórzenie doświadczenia II. 15.IV.1959 r. kiełkowano nasiona kukurydzy na wodzie destylowanej i po odcięciu nasion przeniesiono do słojów dwulitrowych na pożywki bezazotowe. Pozostała procedura metodyczna jest analogiczna do stosowanej w poprzednim doświadczeniu. Stosowano 6-krotne powtórzenia. 29.VI.1959 r. dodano do pożywek azot w następujących formach i ilościach:

a) $(NH_4)_2SO_4$ — 112 mg N na wazon,
b) $Ca(NO_3)_2$ — 112 mg N na wazon,
c) $(NH_4)_2SO_4$ — 56 mg N na wazon,
d) $Ca(No_3)_2$ — 56 mg N na wazon.



Ryc. 2. Doświadczenie V. Wzrost kukurydzy na azotanach, względnie solach amonowych po 74 dniach głodu azotowego. Wazony *23* i *24* — azot dodano w formie $Ca(NO_3)_2$; wazony *34* i *37* — azot dodano w formie $(NH_4)_2SO_4$

Growth of maize plants on nitrate or ammonium salts after 74 days nitrogen starvation. Pots: *23* and *24* — nitrogen added in $Ca(NO_3)_2$ form; pots *34* and *37* — nitrogen added in $(NH_4)_2SO_4$ form

Rośliny podobnie jak w poprzednich doświadczeniach na dodanie azotu zareagowały obfitą guttacją. 20.VII rośliny sfotografowano i doświadczenie zakończono. Z materiałem roślinnym postępowano analogicznie jak w poprzednim doświadczeniu.

Tabela 5 i fotografie przedstawiają wyniki doświadczenia. Z tabeli widzimy, że sucha masa roślin, które otrzymały azot w formie azotanowej jest prawie 2,5-krotnie wyższa od suchej masy roślin, które otrzymały azot w formie amonowej. Także ilość pobranego azotu azotanowego jest prawie o 30% wyższa niż azotu amonowego. Podobnie jak w poprzednim doświadczeniu stwierdzamy większą zawartość cukrów rozpuszczalnych w roślinach, które otrzymały azot amonowy, w porównaniu z tymi wartościami dla roślin, które otrzymały azot azotanowy.

Zawartość wolnych kwasów organicznych nie wykazuje prawidłowości w odniesieniu do tego czynnika. Przedstawione dane w tym doświadczeniu wykazały, że azotany w kulturach nie przewietrzanych stanowią korzystniejszą formę azotu dla roślin również po długotrwałym głodzie azotowym. Dlatego wyniki doświadczenia II należy objaśniać niską temperaturą otoczenia i słabą insolacją w czasie wegetacji roślin po dodaniu azotu do pożywki. Interesujący jest fakt, że mimo dużych ilości zasymilowanego azotu przez rośliny po długotrwałym głodzie azotowym, wobec zmniejszonej zawartości w roślinach cukrów rozpuszczalnych, nie notowano w ogóle zatrucia roślin amoniakiem.

DOŚWIADCZENIE VI

W tym doświadczeniu przeprowadzono badania nad wpływem azotanów względnie soli amonowych na dynamikę parcia korzeniowego kukurydzy po 69 dniach głodu azotowego. Zastosowanie do badań nad asymilacją azotu roślin, które rosły na pożywkach bezazotowych, pozwoliło na bezpośrednie wykazanie zależności procesów aktywnego pobierania i wydalania wody przez rośliny z ich metabolizmem azotowym. Tak wygłodzone rośliny mogą stanowić bardzo czuły test na reakcję roślin na dodanie azotu. pozwalający w sposób bezpośredni obserwować zależność procesów pobierania azotu przez rośliny i czynnego pobierania i wydalania przez nie wody. Zdolność roślin do guttacji po długotrwałym głodzie azotowym została wykazana: pozostało przeto wyjaśnienie zagadnienia wielkości stymulacji oraz dynamiki aktywnego pobierania i wydalania wody przez rośliny po dodaniu do pożywki azotu w formie azotanowej i amonowej w porównaniu z tymi wielkościami dla roślin kontrolnych. Zbadanie tych zagadnień stało się przedmiotem tego doświadczenia.

Z b i ó r s o k u p ł a c z u. Zbiór soku płaczu z roślin, które rosły na pożywkach pełnych, nie nastręcza większych trudności, ze względu na pokaźne rozmiary roślin i duże ilości wydzielanego przez nie soku płaczu.

Tabela 5 — Table 5

Asymilacja azotu przez kukurydzę po 74 dniach głodu azotowego

Nitrogen assimilation by maize after 74 days of N- starvation

mg N na wazon w formie mg N on pot in form	Część nadziemna Tops					Korzenie Roots			
	sucha masa z wazonu w g dry matter on pot in g	pobranego N z wazonu w mg mg N uptake in pot	cukry redukujące w % suchej masy reducing carbohydrates in % dry matter	sacharoza w % suchej masy saccharose in % dry matter	wolne kwasy organiczne w miliekwiwalentach na 100 g suchej masy the free organic acids in miliequivalents on 100 g dry matter	sucha masa z wazonu w g dry matter on pot in g	cukry redukujące w % suchej masy reducing carbohydrates in % dry matter	sacharoza w % suchej masy saccharose in % dry matter	wolne kwasy organiczne w miliekwiwalentach na 100 g suchej masy the free organic acids in miliequivalents on 100 g dry matter
NH_4 112	1,70	75	2,80	0,85	53,25	0,42	1,37	0,21	28,75
NO_3 112	4,10	108	1,91	0,19	46,00	1,10	1,70	0,70	28,00
NH_4 56	1,19	31	3,30	0,42	45,50	0,48	3,15	0,01	30,25
NO_3 56	2,85	52	2,70	0,01	46,00	0,82	1,65	0,02	30,00

W przypadku roślin, które rosły na pożywkach bezazotowych, bardzo cienka łodyga oraz małe ilości wydzielanego soku płaczu wymagały pewnych zabiegów w celu uniknięcia najmniejszych strat soku płaczu i pełnego jego zbioru. W tym przypadku nie można się było pokusić o zachowanie warunków jałowości w czasie zbioru soku płaczu, gdyż już kropla tego roztworu wprowadzona do zbiornika mogła stykając się bezpośrednio z pieńkiem rośliny zaciemnić wyniki doświadczenia. Do zbioru soku płaczu użyto tego samego typu zbiorników, które stosowano w doświadczeniach III i IV w I części pracy.

W celu uzyskania jak najmniejszego otworu w zbiorniku zrobiono maleńkie otwory przy pomocy rozżarzonej igły. Po rozciągnięciu gumy nakładano zbiornik na ścięty pieniek rośliny, po czym brzegi wokół łodygi i zbiornika pokryto cienką warstwą lanoliny. W ten sposób uzyskano dobrą szczelność zbiorników. Sok płaczu zbierano mikrokapilarą i przenoszono do probówek. Rośliną doświadczalną była kukurydza. Nasiona kiełkowano 20.VIII.1959 r. na wodzie destylowanej i po tygodniu po odcięciu nasion przeniesiono na pożywki bezazotowe. pH ustalono na 6,0. Rośliny wegetowały na pożywkach bezazotowych w ciągu 69 dni. Po tym czasie przeniesiono je wraz ze słojami do pracowni i użyto do doświadczeń. Temperatura w pracowni w czasie trwania doświadczenia wahała się od 14,5—16,0°C. Schemat doświadczenia był następujący:

1) Kontrola — 5 wazonów, po 10 roślin; bez azotu,

2) dodano 112 mg N do 2-litrowego wazonu — 5 wazonów, 10 roślin; azot dodano w formie $Ca(NO_3)_2$,

3) dodano 112 mg N do 2-litrowego wazonu — 5 wazonów po 10 roślin; azot dodano w formie $(NH_4)_2SO_4$.

Po 6 godzinach od chwili dodania azotu do pożywki po przetarciu łodygi watką zwilżoną etanolem ścięto część nadziemną na wysokości 4 cm od szyjki korzeniowej i nałożono zbiorniki na sok płaczu. Z sokiem płaczu wykonano następujące próby:

1) na zawartość azotu amonowego i azotanowego,

2) zmierzono objętość soku płaczu,

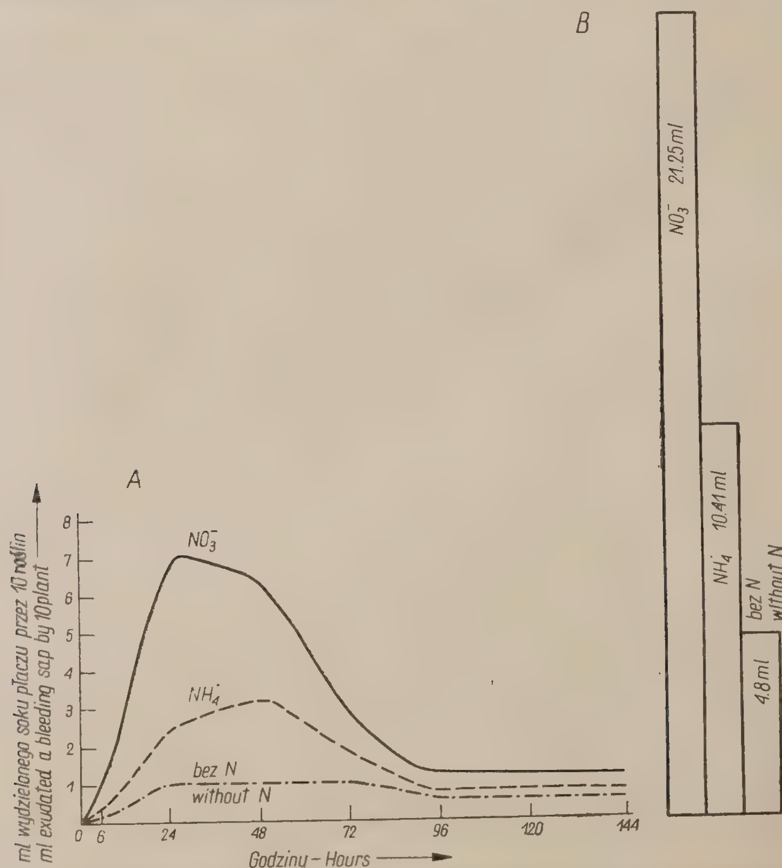
3) oznaczono pH,

4) badano, czy po dodaniu etanolu do soku płaczu wytrąca się biały osad białka.

Wykresy *A* i *B* przedstawiają wyniki doświadczenia w odniesieniu do dynamiki parcia korzeniowego i ogólnych ilości soku płaczu.

Z wykresu *A* widzimy, że rośliny, które otrzymały azot w formie azotanowej po 24 godzinach, wydzieliły prawie 3-krotnie więcej soku płaczu niż rośliny, które otrzymały azot w formie amonowej i 7-krotnie więcej niż rośliny kontrolne. Jest to jednocześnie maksymalna ilość soku płaczu uzyskana w czasie 24 godzinach. Po 48 godzinach obserwujemy lekki

spadek ilości wydzielonego soku płaczu przez rośliny, które otrzymały azot azotanowy, i jednocześnie w tymże czasie obserwujemy maksimum wydzielonego soku płaczu przez rośliny z azotem w formie amonowej. Rośliny kontrolne nie wykazują zmian. Po 72 godzinach obserwujemy gwałtowne obniżenie intensywności tego procesu tak w kombinacji z azotem amonowym jak i azotanowym. W odniesieniu do roślin kontrolnych podobnego spadku nie zanotowano. Po 96 godzinach obserwujemy dalszą obniżkę ilości wydzielanego soku płaczu we wszystkich kombina-



Ryc. 3. *A* — Dynamika parcia korzeniowego kukurydzy po 69 dniach głodu azotowego; *B* — całkowita ilość soku płaczu w ml

A — The dynamic of root pressure of maize plant after 69 days nitrogen starvation; *B* — Total of bleeding sap in ml

cjach. Po 120 i 144 godzinach nie obserwujemy już jakichkolwiek zmian w intensywności tego procesu, zachowują się jednak różnice w ilości wydzielanego soku płaczu w odniesieniu do kombinacji, a mianowicie: najwięcej soku płaczu wydzielają rośliny, które otrzymały azot azotanowy, następnie amonowy i najmniej rośliny kontrolne. Próby z sokiem

płaczu na zawartość azotu azotanowego, zebranym po 24 godzinach od chwili ścięcia części nadziemnej, wypadły dodatnio w kombinacji azotanowej; w soku płaczu tych roślin stwierdzono również azot amonowy. W soku płaczu roślin, które otrzymały azot amonowy, oraz roślin kontrolnych wykryto tylko azot w formie amonowej. pH soku płaczu z tych kombinacji wynosiło 5,8 i nie wykazało jakichkolwiek różnic w odniesieniu do formy dodanego azotu. Po dodaniu do soku płaczu etanolu zanotowano wypadnięcie kłaczkowatego białego osadu, podobnego do opisanego w I części pracy (dośw. III), który okazał się białkiem. Oceniając porównawczo największy osad zanotowano w kombinacji z azotem azotanowym, mniejszy z azotem amonowym i najmniejszy w kontroli. Interesujące były dalsze obserwacje. Otóż po 7 dniach w probówkach z sokiem płaczu zebranym z roślin, które otrzymały azot amonowy rozwinęły się mikroorganizmy, które spowodowały zabarwienie soku płaczu na zielono, natomiast w soku płaczu roślin, które otrzymały azot azotanowy i bez azotu zjawiska tego nie zanotowano, mimo że obserwowano zmętnienie roztworów, a na powierzchni stwierdzono powstanie białej błonki. Wykonane z tym sokiem płaczu próby na zawartość w nim azotu amonowego i azotanowego we wszystkich wypadkach wypadły dodatnio.

DOŚWIADCZENIE VII, VIII i IX

Wpływ inhibitorów KCN, NaN_3 i 2,4-dwunitrofenolu na guttację roślin po długotrwałym głodzie azotowym badano w niżej opisanych doświadczeniach.

Wyniki poprzednich badań, przeprowadzonych w tej części pracy, wyłoniły szereg zagadnień, rozwiązanie których stało się przedmiotem nowych doświadczeń. Interesowały nas zagadnienia:

1) jaki wpływ na guttację wykażą inhibitory KCN, NaN_3 i 2,4-dwunitrofenolu,

2) wobec wykazanej stymulacji aktywnego pobierania i przewodzenia wody przez rośliny pod wpływem azotu, interesujące było zbadanie działania azotu na ten proces przy jednoczesnym dodaniu do pożywek azotu i inhibitorów.

Zastosowanie inhibitorów w badaniach procesów aktywnego pobierania i przewodzenia wody przez rośliny dało interesujące wyniki, aczkolwiek wnioski wynikające z tych badań są rozbieżne. J. van Overbek (1942), H. F. Rosene (1944) wykazali, że KCN powoduje częściową inhibicję parcia korzeniowego. Autorzy przypuszczają, że być może pobieranie wody ma charakter nieosmotyczny, ponieważ KCN niecałkowicie hamuje oddychanie. Jednakże liczni autorzy nie wykazali korelacji między oddychaniem i aktywnym pobieraniem wody. P. J. Kramer (1956)

przypuszcza, że redukcja oddychania być może zmniejsza przenikliwość korzeni dla wody. Autor wypowiada możliwość, że nieosmotyczne pobieranie wody jest bezpośrednio uzależnione od energii wyzwalanej w procesie oddychania, lecz przypuszczenie to nie zostało udowodnione. W tym aspekcie interesująca jest praca J. Bonnera, R. S. Bandurskiego i A. Millerd (1953), którzy badali wpływ auksyny na oddychanie i pobieranie wody, z roztworów o różnym stężeniu osmotycznym, przez krążki karczocha, w obecności auksyny i inhibitorów 2,4 dwunitrofenolu (DNP), HCN i kwasu malonowego. Autorzy wykazali, że 2,4 DNP znosi stymulujące działanie auksyny na pobieranie wody przez krążki karczocha, powodując całkowite zahamowanie tego procesu, mimo że intensywność oddychania w obecności 2,4 DNP ulega prawie 2-krotnemu zwiększeniu. Zwiększenie stężenia roztworu zewnętrznego w obecności auksyny powoduje zmniejszenie tak pobierania wody jak i intensywności oddychania, przeto autorzy ci twierdzą, że wpływu auksyny należy upatrywać raczej w jej działaniu na akumulację wody niż na oddychanie. Autorzy podają jednocześnie wyniki badań nad inhibicją oddychania krążków karczocha przez HCN, który we wszystkich przypadkach całkowicie hamował oddychanie, a kwas malonowy hamował ten proces w 26%. Niestety badań tych nie przeprowadzono z równoczesnymi badaniami pobierania wody. Autorzy twierdzą, że działanie auksyny w tym procesie połączone jest z tworzeniem się wysokoenergetycznych związków fosforowych ATP. Działanie 2,4 DNP i NaN_3 powoduje zahamowanie procesu przenoszenia bogatych energetycznie reszt fosforanowych (W. F. Loomis, F. Lipmann 1948, W. O. James 1953). C. A. Price i R. E. Davies (1954) wykazali udział energii wysokoenergetycznych związków fosforowych w aktywnym pobieraniu i przewodzeniu wody przez mitochondria zwierzęce. R. N. Robertson, M. J. Wilkins i D. C. Weeks (1951) badali wpływ 2,4 DNP na pobieranie soli oraz oddychanie i wykazali, że 2,4 DNP hamuje pobieranie soli przez rośliny, podczas gdy oddychanie czułe na cjanki ulegało zwiększeniu. Wynika stąd wniosek, że pobieranie soli jest bezpośrednio uzależnione od energii wyzwalanej w procesie fosforylacji.

Metoda badań. Aby przekonać się o wpływie inhibitorów na występowanie guttacji u roślin, należało zastosować takie warunki, które by wykluczały wpływ innych czynników na ten proces. Wydaje się, że warunek ten może być spełniony przy hodowli roślin na wodzie destylowanej. Z drugiej strony, w celu zbadania wpływu soli na ten proces, należało przeprowadzić analogiczne badania w ich obecności.

Doświadczenia przeprowadzono w okresie zimowym 1959 r., w warunkach szklarniowych. Rośliną doświadczalną była kukurydza. 30.I kiełkowano nasiona i po tygodniu, po odcięciu nasion, siewki przeniesiono

do dwulitrowych słojów szklanych. Nastawiono 32 słoje po 2 rośliny w każdym słoju na wodzie destylowanej (I seria) i tyleż samo na pożywce bezazotowej, analogicznej do użytej w poprzednich doświadczeniach tej części pracy (seria II). pH pożywki bezazotowej oraz wody ustalono na 6.0 i kontrolowano w czasie wegetacji. Temperatura w szklarni wahała się w granicach 14—20°C.

Doświadczenie VII. Po 6 tygodniach wegetacji roślin dla stwierdzenia zdolności do guttacji wykonano następujące doświadczenie. Po dwa słoje z roślinami z każdej serii nakryto szklanymi słojami wyłożonymi wewnątrz wilgotną watą i bibułą filtracyjną do 1/3 wysokości słoja. Po 6 godzinach od chwili nakrycia wazonów zanotowano występowanie kropel roztworu guttacyjnego na liściach roślin w obu seriach. Wykonane próby z odczynnikiem Nesslera wykazały obecność w roztworze guttacyjnym azotu amonowego.

Wynik ten był wielce interesujący ze względu na wykazaną zdolność do guttacji roślin po długotrwałym głodzie azotowym, przy czym w roztworze guttacyjnym stwierdzono azot. Należy przypuszczać, że wykrywany azot w roztworze guttacyjnym był wynikiem rozpadu białka w roślinach. A trzeba pamiętać, że rośliny hodowane były w ciągu 6 tygodni na pożywkach bezazotowych oraz na wodzie destylowanej.

W doświadczeniu VIII badano wpływ KCN, NaN_3 i 2,4-dwunitrofenolu na guttację roślin. W każdej serii użyto po 12 słojów z roślinami, po 2 słoje w każdym wariancie:

Seria I. Woda destylowana z dodatkiem:

a) KCN 10^{-3} M/l
b) KCN 10^{-4} M/l
c) NaN_3 10^{-3} M/l
d) NaN_3 10^{-4} M/l
e) 2,4 DNP 10^{-4} M/l
f) 2,4 DNP 10^{-5} M/l

Seria II. Pożywka bezazotowa.
Idem.

W doświadczeniu 8 uzyskano wyniki:

ad. Seria I.

a) Po 6 godzinach od chwili dodania KCN i nakrycia słojów kloszami notujemy występowanie pierwszych kropel roztworu guttacyjnego na liściach roślin. W roztworze guttacyjnym stwierdzono azot w formie amonowej. Po 4 dniach guttacja zanika, rośliny tracą turgor i po tygodniu giną.

b) Po 6 godzinach obserwujemy występowanie guttacji u roślin. Proces ten nie słabnie aż do czasu likwidacji doświadczenia, tj. do 10 dni. W roztworze guttacyjnym stwierdzamy azot w formie amonowej.

c) Guttacja nie wystąpiła. Następnego dnia rośliny tracą turgor i giną.

d) Jak w p.c.

e) Guttacji nie zanotowano. Po 3 dniach rośliny tracą turgor i po tygodniu giną.

f) Jak w p. e.

ad. Seria II. Wyniki działania inhibitorów na guttację roślin były analogiczne do opisanych dla serii I.

Doświadczenie IX. Wpływ KCN, NaN_3 i 2,4-dwunitrofenolu na guttację roślin w obecności azotanów bądź soli amonowych. W każdej serii użyto po 16 wazonów po 2 wazony w każdym wariancie:

Seria I. Woda destylowana z dodatkiem:

a) $(NH_4)_2$ SO_4 $2 \cdot 10^{-3}$ M/l
b) $Ca(NO_3)_2$ $2 \cdot 10^{-3}$ M/l
c) $(NH_4)_2$ SO_4 $2 \cdot 10^{-3}$ M/l + KCN 10^{-3} M/l
d) $(NH_4)_2$ SO_4 $2 \cdot 10^{-3}$ M/l + NaN_3 10^{-3} M/l
e) $(NH_4)_2$ SO_4 $2 \cdot 10^{-3}$ M/l + 2,4 DNP 10^{-5} M/l
f) $Ca(NO_3)_2$ $2 \cdot 10^{-3}$ M/l + KCN 10^{-3} M/l
g) $Ca(NO_3)_2$ $2 \cdot 10^{-3}$ M/l + NaN_3 10^{-3} M/l
h) $Ca(NO_3)_2$ $2 \cdot 10^{-3}$ M l + 2,4 DNP 10^{-5} M/l

Seria II. Pożywka bezazotowa.
Idem.

Wyniki tego doświadczenia przedstawiają się następująco:

ad. Seria I.

a) Guttacja wystąpiła już po 4 godzinach od chwili dodania do pożywki siarczanu amonu. W roztworze guttacyjnym stwierdzamy azot w formie amonowej. Proces ten zachodzi aż do likwidacji doświadczenia (10 dni).

b) Silna guttacja już po 3 godzinach. W roztworze guttacyjnym stwierdzamy azot azotanowy i azot amonowy. Proces zachodzi aż do likwidacji doświadczenia.

c) Po 8 godzinach bardzo słaba guttacja. Po 2 dniach zanik procesu, rośliny więdną i giną.

d) Guttacji nie stwierdzono. Następnego dnia zanik turgoru u roślin i po 3 dniach rośliny giną.

e) Jak w p. d.

f) Bardzo słaba guttacja. W roztworze guttacyjnym stwierdzamy azot amonowy. Po 4 dniach zanik turgoru i rośliny giną.

g) Guttacji nie stwierdzono. Po 3 dniach zanik turgoru i rośliny giną.

h) Jak w p. g.

ad. Seria II.

Wyniki analogiczne do uzyskanych w serii I. Wyżej opisane doświadczenie VII wykazało, że rośliny hodowane na wodzie destylowanej i na pożywkach bezazotowych bez dodania azotu do pożywki również zdolne są do guttacji (w warunkach wilgotnej kamery). Wobec nieobecności azotu w pożywce i w wodzie destylowanej wydzielany w roztworze guttacyjnym azot amonowy mógł być skutkiem tylko degradacji białka w roślinach. Z przedstawionych wyżej danych z literatury wynika, że 2,4-dwunitrofenol i azydek sodu powodują rozkojarzenie procesów utleniania i fosforylacji. Z otrzymanych danych o działaniu tych inhibitorów na guttację u roślin wyłania się wniosek o udziale energii wysokoenergetycznych związków fosforowych w procesie aktywnego pobierania i przewodzenia wody przez rośliny, którego przejawem jest parcie korzeniowe i guttacja.

DYSKUSJA

Szeroki krąg zagadnień, które wyłoniły się w związku z przeprowadzonymi badaniami, wymaga oddzielnego omówienia ich w kolejności w celu znalezienia możliwego związku między nimi.

W tej części pracy stwierdzono następujące fakty:

1. Zdolność do guttacji roślin w warunkach wilgotnej kamery hodowanych na pożywkach bezazotowych i na wodzie destylowanej.

2. Zdolność roślin hodowanych w ciągu długiego okresu czasu na pożywkach bezazotowych do asymilowania azotu mineralnego.

3. Azotany są korzystniejszą formą azotu dla roślin w warunkach słabego natlenienia podłoża także po długotrwałym głodzie azotowym.

4. Dodanie do pożywek azotu spowodowało wzrost i rozwój roślin.

5. Azotany i sole amonowe stymulują proces aktywnego pobierania i przewodzenia wody przez rośliny, przy czym azotany stymulują ten proces w wyższym stopniu niż sole amonowe.

6. Proces aktywnego pobierania i przewodzenia wody przez rośliny jest uzależniony od metabolizmu azotowego roślin.

7. Inhibitory powodujące rozkojarzenie procesu utleniania i fosforylacji całkowicie hamują guttację u roślin.

Zjawisko guttacji, jak i płacz roślin, objaśniane jest jako skutek parcia korzeniowego. Parcie korzeniowe jest przejawem aktywnego pobierania i przewodzenia wody przez rośliny i wymaga wkładu wolnej energii.

Zagadnienie aktywnego pobierania i przewodzenia wody przez rośliny omawiane jest szczegółowo przez licznych autorów, m. in. P. J. Kramera (1956), C. R. Stockinga (1956), A. S. Craftsa, H. B. Curriera i C. R. Stockinga (1948) oraz P. Strebeyko (1956). Jednakże, mimo wysiłków licznych autorów, mechanizm parcia korzeniowego jest dotąd mało poznany. Najważniejszymi dowodami na istnienie zależności tego procesu od metabolizmu żywych komórek jest to, że parcie korzeniowe ustaje, jeżeli zabije się system korzeniowy lub izoluje się go od dostępu tlenu. D. A. Sabinin (1955) podaje następującą definicję parcia korzeniowego: „jest to proces jednostronnego prądu wody i rozpuszczonych w niej substancji, zależny od utleniania asymilatów". W odniesieniu do tej definicji N. A. Maksimow (1952) pisze: „wypełnienie konkretną treścią tego stosunkowo abstrakcyjnego określenia jest zadaniem przyszłych badaczy". F. C. Steward, P. R. Stout i C. Preston (1940) badali pobieranie wody przez krążki wycięte z bulwy ziemniaka i stwierdzili, że potas i jony azotanowe w przeciwieństwie do wapnia stymulowały ten proces. Autorzy wypowiedzieli hipotezę o zależności procesów pobierania wody z absorpcją soli, oddychaniem tlenowym i syntezą białka. Według H. Lundegradha (1946) energia tzw. „oddychania anionowego" jest wykorzystywana przy aktywnym pobieraniu jonów przez protoplazmę. Należy przypuszczać, że jest ona również wykorzystywana w procesach aktywnego pobierania i przewodzenia wody przez rośliny. J. van Overbek (1942) wykazał, że stężenie roztworu zewnętrznego powodujące zanik parcia korzeniowego jest często 2-krotnie wyższe niż stężenie roztworu soku płaczu. Na tej podstawie autor twierdzi, że parcie korzeniowe jest częściowo zjawiskiem osmotycznym, a częściowo jest wynikiem wydzielania wody przez żywe komórki. Interesujące są również doświadczenia F. M. Eatona (1943). Stwierdził on, że stężenie roztworu guttacyjnego jest często mniejsze niż stężenie roztworu zewnętrznego, przeto wydaje się, że komórki pochłaniają większość soli, zanim przesuną się one na znaczną odległość w korzeniach lub w łodydze, a także że podwyższenie ciśnienia osmotycznego roztworu zewnętrznego powoduje zanik parcia korzeniowego. Według opinii autora „zjawisko parcia korzeniowego można zadowalająco objaśnić na podstawie różnicy między ciśnieniem osmotycznym w naczyniach ksylemu i sumą osmotycznych i kapilarnych sił w roztworze zewnętrznym". O wpływie poszczególnych substancji na guttację i płacz roślin mamy tylko nieliczne dane. C. Monfort (1920) stwierdził, że woda pochodzenia sfagnowego powoduje w ciągu pierwszych dni zwiększenie inten-

sywności guttacji u kukurydzy, po czym zjawisko to słabnie i ustaje. F. C. Skoog, T. C. Broyer i K. A. Grossenbacher (1938) wykazali, że auksyna powoduje zwiększenie intensywności guttacji. Poza tym K. A. Grossenbacher (1939) stwierdził, że eksudacja dekapitowanych roślin słonecznika wykazuje dobowy rytm. Fizjologiczne znaczenie guttacji dla roślin także nie jest wyjaśnione. Według G. Haberlandta (1894, 1895) guttacja, która jest szczególnie rozpowszechnionym zjawiskiem w strefie zwrotnikowej, jest procesem korzystnym, gdyż powodując nieprzerwany przepływ wody przez rośliny zwiększa zaopatrzenie roślin w sole mineralne. L. C. Curtis (1943) na podstawie doświadczeń wykazał, że roztwór guttacyjny jest szkodliwy dla liści. Szkodliwe działanie tego roztworu przejawia się np. u kukurydzy, tzw. poparzeniem wierzchołka liścia (tip burn) wyrażającym się w skręcaniu i więdnięciu wierzchołka liścia. Przyczyny tego stanu wg autora mogą być następujące:

1. Roztwór guttacyjny wyparowując staje się roztworem hipertonicznym.

2. Małe ilości substancji, które nie wykazują toksycznego działania w roztworze rozcieńczonym, mogą wykazać tego rodzaju działanie w roztworze stężonym.

3. Roztwór guttacyjny może absorbować szkodliwe gazy atmosfery.

4. W roztworze guttacyjnym rozwijają się bakterie i drożdże, które mogą zmienić skład roztworu lub wydzielić substancje toksyczne dla liści.

5. Mogą tworzyć się nowe substancje dzięki działalności enzymów wydzielonych wraz z roztworem guttacyjnym, które mogą okazać się toksyczne dla liści.

Przytoczony powyżej przegląd literatury wykazuje, że zjawiska guttacji i płaczu roślin są interpretowane przez badaczy bardzo rozmaicie.

Na podstawie osiągniętych wyników w naszych badaniach wykazano specyficzny wpływ azotu mineralnego na wystąpienie guttacji u roślin hodowanych w ciągu długiego czasu na pożywkach bezazotowych.

Szybkie występowanie guttacji po dodaniu do pożywki azotu wskazywałoby na zwiększenie przepuszczalności protoplazmy komórek korzenia pod wpływem tego czynnika dla wody. Jednakże mechanizm tego wpływu jest niejasny i wymaga dalszych badań. Możliwość wytworzenia się odmiennego metabolizmu roślin w rezultacie długotrwałego głodu azotowego komplikuje zjawisko. Fakt, iż guttację obserwowano w ciągu stosunkowo długiego czasu od chwili dodania azotu do pożywek, wzrost i rozwój roślin po tym zabiegu oraz asymilacja azotu przez rośliny bezsprzecznie przemawiają za powiązaniem występowania guttacji z metabolizmem azotowym roślin. Byłby to więc dowód popierający tezę

F. C. Stewarda, P. R. Stouta i C. Prestona o zależności pobierania wody, soli mineralnych, metabolizmu białkowego i oddychania tlenowego. Jednakże brak w naszych doświadczeniach danych o oddychaniu korzeni przed i po dodaniu azotu do pożywek nie pozwala na wyciągnięcie ostatecznego wniosku. Jest rzeczą interesującą, czy wystąpienie guttacji u roślin hodowanych na pożywkach bezazotowych jest specyficzną reakcją roślin tylko w odniesieniu do tego pierwiastka, czy też i do innych pierwiastków i związków. Fizjologiczną rolę guttacji w naszych warunkach, wydaje się, można objaśnić tym, że wydzielanie azotu w roztworze guttacyjnym przez rośliny w formach wniesionych do pożywek występowało dlatego, że wobec braku asymilatów dla pełnej asymilacji podanego azotu, część tegoż rośliny wydzielały jako składnik nie wykorzystany lub szkodliwy i zbędny dla organizmu roślinnego. Interesujący jest fakt, że w okresie występowania guttacji u roślin nie stwierdzono objawów zatrucia roślin po dodaniu azotu. Przedstawione poglądy L. C. Curtisa, o szkodliwości roztworu guttacyjnego dla liści roślin. w naszych doświadczeniach nie uzyskały potwierdzenia; mimo obfitego występowania guttacji u kukurydzy, nigdy nie zauważono objawów uszkodzenia liści po wyparowaniu roztworu guttacyjnego. Wprost przeciwnie pozostałe 2 nie wyschnięte liście, na których właśnie obserwowano krople roztworu guttacyjnego, w krótkim czasie zazieleniły się i powiększyły swoje rozmiary. Wydaje się, że pogląd autora jest słuszny w przypadku, kiedy rośliny są obficie zaopatrywane w składniki mineralne. Przedstawione dane o dynamice parcia korzeniowego kukurydzy po dodaniu azotu do pożywek po 69-dniowym głodzie azotowym (dośw. 6) całkowicie potwierdziły wyniki uzyskane w dośw. III, I części pracy o stymulującej roli azotanów na proces aktywnego pobierania i przewodzenia wody przez rośliny.

W tym doświadczeniu wykazaliśmy ponadto, że azot amonowy stymuluje ten proces w stopniu niewspółmiernie mniejszym niż azotany. Wyniki tego doświadczenia rzucają jeszcze jedno bardzo interesujące światło na zagadnienie warunków, w których parcie korzeniowe roślin występuje. Ogólnie bowiem wśród fitofizjologów przyjęty jest pogląd, że warunkiem do przejawienia się parcia korzeniowego jest dobre zaopatrzenie systemu korzeniowego w substancje organiczne. D. A. Sabinin (1955) w monografii pt. *Fizjołogiczeskije osnowy pitania rastieni* na str. 109 pisze: „niezbędnym warunkiem podtrzymania aktywnego pochłaniania wody przez system korzeniowy jest prąd substancji organicznych z części nadziemnej do korzeni". Zadziwiający jest wynik doświadczenia z roślinami hodowanymi na pożywkach bezazotowych i wodzie destylowanej. Wydzielały one stałe ilości soku płaczu w ciągu 72 godzin i tylko po 96 godzinach od chwili ścięcia części nadziemnej ilości te zmniejszyły się o 40%

utrzymując się na tym poziomie przez dalsze 48 godzin. Rośliny te wydzielały ponadto białko. Wydaje się przeto, że proces aktywnego pobierania i przewodzenia wody przez rośliny jest bardzo ściśle powiązany z metabolizmem azotowym roślin. Za tym wnioskiem przemawia fakt stymulacji procesu przez azotany oraz w mniejszym stopniu przez sole amonowe. Ciekawy jest fakt bardzo szybkiej asymilacji podanego azotu przez rośliny. Świadczy to o dużej aktywności systemu korzeniowego tych roślin. W odniesieniu do pobierania azotu przez rośliny (dośw. III i IV), uzyskane dane potwierdzają wcześniejsze wyniki badań P. Strebeyko (1932), który wykazał, że azot azotanowy w wyższej temperaturze jest intensywniej pobierany niż azot amonowy, trzeba bowiem zaznaczyć, że w czasie wegetacji roślin temperatura powietrza w czasie dnia przewyższała często nawet 30°C. Uzyskane dane w doświadczeniu III wykazały, że w roślinach po długotrwałym głodzie azotowym ulega znacznemu zwiększeniu ilość wolnych kwasów organicznych. Wydaje się przeto, że odgrywają one pierwszorzędną rolę w możliwości asymilacji dodanego azotu do pożywki wobec zmniejszonych ilości cukrów rozpuszczalnych w roślinie. Jaki jest mechanizm stymulującego wpływu azotanów i soli amonowych na proces aktywnego pobierania i przewodzenia wody przez rośliny? W przypadku azotanów wydaje się, że aktywizacja procesów oksydoredukcyjnych w komórkach roślinnych pod wpływem tej formy azotu mogłaby najogólniej objaśnić przyczynę tego stanu rzeczy (wyniki doświadczenia 3, I części pracy). Mechanizm stymulującego wpływu na ten proces azotu amonowego wydaje się jest także powiązany z procesami oksydoredukcyjnymi. W tym aspekcie interesujące są wyniki badań J. A. Beckinga (1956) nad mechanizmem pobierania jonów NH_4 przez korzenie kukurydzy. Wykazał on mianowicie, że korzenie roślin po krótkotrwałym głodzie azotowym (9—11 dni) wykazywały zwiększenie intensywności oddychania po dodaniu azotu amonowego, natomiast ekwiwalentne ilości siarczanu potasu lub siarczanu sodu tego działania nie wykazały. Autor przypuszcza istnienie tzw. oddychania „kationowego", które spowodowane jest wyłącznie przez pochłanianie kationów NH_4 przez korzenie roślin. Wykazano (dośw. 7, 8, 9), że inhibitory KCN, NaN_3 i 2.4-dwunitrofenol wykazują niejednakowy wpływ na guttację roślin KCN w stężeniu 10^{-3M} w pierwszym okresie (4 dni) nie hamuje guttacji, a dziesięciokrotnie niższe stężenie KCN nie wykazało widocznego hamującego wpływu na ten proces w czasie trwania doświadczenia (10 dnia). Natomiast NaN_3 i 2,4-DNP, a więc związki powodujące rozkojarzenie procesów utleniania i fosforylacji całkowicie hamowały guttację w użytych stężeniach. Wyniki te wskazują na bezpośredni udział energii pochodzącej z wysokoenergetycznych związków fosforowych w procesie aktywnego pobierania i przewodzenia wody przez rośliny. Zastosowanie

do badań roślin hodowanych w ciągu długiego okresu czasu na pożywkach bezazotowych wykazało, że rośliny takie stanowią bardzo czuły test pozwalający stwierdzić istnienie zależności między pobieraniem azotu przez rośliny i jego asymilacją a procesem aktywnego pobierania i przewodzenia wody przez rośliny.

STRESZCZENIE

W latach 1958—1959 przeprowadzono badania nad asymilacją azotu mineralnego przez rośliny po różnych okresach głodu azotowego.

Wykazano, że rośliny kukurydzy hodowane na pożywkach bezazotowych w ciągu 30, 50, 60, 69 i 74 dni wykazują zdolność do intensywnej asymilacji azotu mineralnego. Dodanie azotu do pożywek spowodowało bujny wzrost i rozwój roślin.

Stwierdzono stymulację aktywnego pobierania i przewodzenia wody przez rośliny po dodaniu azotu, przy czym azotany wykazują większy stymulujący wpływ na ten proces niż sole amonowe.

Wykazano, że azotany w warunkach niedostatecznego natlenienia pożywki są korzystniejszą formą azotu także dla roślin po długotrwałym głodzie azotowym.

Dodanie azotu do pożywek powoduje zwiększenie w roślinach zawartości cukrów rozpuszczalnych, a zmniejszenie zawartości wolnych kwasów organicznych. Stwierdzono, że rośliny hodowane na pożywkach bezazotowych w ciągu 69 dni oraz na pożywkach bezazotowych i wodzie destylowanej w ciągu 6 tygodni zachowują zdolność aktywnego pobierania i przewodzenia wody. Proces ten jest związany z metabolizmem azotowym roślin. Wykazano, że KCN w stężeniu 10^{-3} M/l nie hamuje guttacji roślin w ciągu pierwszych 4 dni. KCN w stężeniu 10^{-4} M/l nie wykazuje hamującego wpływu na ten proces. NaN_3 w stężeniach 10^{-3} M/l i 10^{-4} M/l oraz 2,4-dwunitrofenol w stężeniach 10^{-4} M/l i 10^{-5} M/l całkowicie hamują guttację u roślin. Rośliny hodowane na pożywkach bezazotowych w ciągu dłuższego czasu stanowią bardzo czuły test pozwalający na stwierdzenie istnienia zależności procesów aktywnego pobierania i przewodzenia wody przez rośliny i metabolizmu roślin.

SUMMARY

In the years 1958—59 research was conducted on the assimilation of mineral nitrogen by plants after varying periods of nitrogen starving. It has been shown that maize plants after culture on non-nitrogen solutions in 30, 50, 69, 74, days have displayed capacity for intensive assimilation of mineral nitrogen. Addition of nitrogen to culture solutions stimulated intensive growth and development of the plants. After nitrogen had been added stimulation of active uptake and movement of water was observed. The nitrates show greater influence on this process than ammonium salts. It has been shown that nitrates are a more favourable nitrogen form also for plants after continued N-starving in conditions of insufficient oxygen supply of culture solutions. The addition of nitrogen to culture solutions increases soluble carbohydrates content in plants and decreases free organic acids content.

It has been found that plants grown on non-nitrogen culture solutions for 69 days as well as on non-nitrogen solutions and distilled water for 6 weeks retain their capacity for an active uptake and movement of water. This process is

connected with the nitrogenous metabolism in plants. It has been shown that KCN concentrated to 10^{-3} M/l does not hamper the guttation of plants for the first 4 days. KCN concentrated to 10^{-4} M/l does not reveal a retarding effect on this process. NaN_3 concentrated to 10^{-3} M/l and 10^{-4} M/l as well as 2,4, dinitrophenol concentrated to 10^{-4} M/l and 10^{-5} M/l stop completely plant guttation. Plants grown on non--nitrogen culture solutions can serve as highly sensitive test which allows to determine the interrelation of processes concerned with the active uptake and movement of water in plants and with their nitrogenous metabolism.

LITERATURA

Becking J. A., 1956, On the mechanism of ammonium ion uptake by maize roots, Acta bot. neerl. 5. No. 1. 1—79.

Bonner J., Bandurski R. S., Millerd A., 1953, Linkage of respiration to auxin-induced water uptake, Physiol. Plant. 6: 511—523.

Crafts A. S., Currier, H. B., Stocking C. R., 1948, Water in the physiology of plants, Chronica Botanica, Co. Walthman, Mass.

Curtis L. G., 1943, Deleterious effects of guttated fluids of foliage, Amer. Jour. Bot. 30: 778—781.

Eaton F. M., 1943, The osmotic and vitalistic interpretations of exudation. Amer. Jour. Bot. 30: 663—674.

Grossenbacher K. A., 1939, Autonomic cycle of rate of exudation of plants, Amer. Jour. Bot. 26: 107—109.

Haberlandt G., 1894—95, Anatomisch-physiologische Untersuchungen über das tropische Laublatt. II, Sitzb. Wien. Akad. 103: 489—538, 104: 55—116.

Hoffer G. N., Krantz B. A., 1957, Priznaki gołodania rastieni, Tłum. ros. z ang. Sielchozizdat, Moskwa.

James W. O., 1953, The use of respiratory inhibitors, Ann. Rev. Plant Physiol. 4: 59—91.

Kramer P. J., 1956, The uptake of water by plant cells, Handbuch der Pflanzenphysiologie. Band II: 316—328.

Kramer P. J., Physical and physiological aspects of water absorption. Handbuch der Pflanzenphysiologie, Band IV: 124—159.

Loomis W. F., Lipman F., 1948, Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxidation, Jour. Biol. Chem. 173, 807.

Lundegradh H., 1946, Transport of water and salts through plant tissues, Nature 157: 575—577.

Maksimow N. A., 1952, Izbrannyje raboty po zasuchoustoicziwosti i zimostoikosti rastieni, I. 111—206, Izdat AN. SSSR, Moskwa.

Monfort C., 1920. Physiologische Grundlegung einer Guttationsmethode zur relativen Prüfung der Wasseraufnahme, Jahrb. wiss. Bot. 39: 467—524.

Price C. A., Davies S. E., 1954, Active transport of water by mitochondria, Biochem. Jour. 58: No 2. XVII.

Robertson R. N., Wilkins M. J., Weeks D. C., 1951, Studies in the metabolism of plant cells. IX. The effects of 2.4 DNP on salt accumulation and salt respiration, Australian J. Sci. Research (B): 4: 248—264.

Rosene H. F., 1944, Effect of cyanide on rate exudation in excised onion roots. Amer. Jour. Bot. 31: 172—174.

Sabinin D. A., 1955, Fizjołogiczeskije osnowy pitania rastieni, 76—236. Izdat. An SSSR. Moskwa.

Skoog F. T., Broyer T. C., and Grossenbacher K. A., 1938, Effect of auxin on rates, periodicity and osmotic relations in exudations, Amer. Jour. Bot. 25: 749—759.

Steward F. C., Stout P. R., Preston C., 1940, The balance of metabolites for potato discs showing the effect of salts and dissolved oxygen on metabolism at 23°C, Plant Physiol. 15: 409—447.

Stocking C. R., 1956, Guttation and bleeding, Handbuch Der Pflanzenphysiologie, Bd IV: 486—502.

Stocking C. R., 1956, Root pressure, Handbuch der Pflanzenphysiologie Bd 4: 583—586.

Strebeyko P., 1932, Wpływ temperatury na fizjologiczną reakcję azotanu amonowego, Rocczn. Nauk Roln. i Leśn. 28: 1—14.

Strebeyko P., 1956, Woda i światło w życiu rośliny, Państw. Wyd. Naukowe, Warszawa.

Van Overbek J., 1942, Water uptake by excised roots systems of the tomato due to non osmotic forces, Amer. Jour. Bot. 29: 677—683.

ACTA SOCIETATIS
BOTANICORUM POLONIAE
Vol. XXX — Nr 2
1961

Cukrowce w łodygach i tumorach *Datura stramonium* L.

Carbohydrates in healthy and tumorous stem tissues of Datura stramonium L.

H. ŁUKASIAK

WSTĘP

Prace nad tumorami roślinnymi stanowią jak dotąd tylko drobną część obszernej literatury o nowotworach. Większość bowiem badań nad zagadnieniami wzrostu patologicznego dotyczy fizjologii, biochemii i terapii nowotworów zwierzęcych.

Znane są próby (Greenstein 1959) zmierzające do ustalenia schematu niektórych przemian biochemicznych dla nowotworów zwierzęcych atakujących różne organy.

Dopiero w ostatnich latach ukazuje się nieco więcej prac poświęconych nowotworom roślinnym, a dotyczących, między innymi, swoistości przemian biochemicznych zachodzących w tumorach. Szczególne zainteresowanie budzi zagadnienie intensywności oddychania tkanek nowotworowych.

Według niektórych autorów (Klein 1952, Racker 1959 cyt. w pracy Greensteina) zużycie cukrowców w procesach oddychania przebiega podobnie w tumorach roślinnych jak i zwierzęcych, a intensywność tych procesów jest zawsze wyższa w tkankach rakowatych niż normalnych. Klein (1952) stwierdził, że tkanki tumorów roślinnych wykazują intensywniejsze oddychanie niż tkanki zdrowe.

Metabolizm cukrowców w tkankach nowotworowych kształtuje się w kierunku wytwarzania znacznych ilości kwasu mlekowego (Racker, Alpers 1959 cyt. w pracy Greensteina).

Ponieważ stwierdzono, że w tkankach rakowatych zwierzęcych (Racker cyt. w pracy Greensteina 1959) zużycie cukrowców prostych jest szybsze niż w tkankach zdrowych, wydawało się interesujące zagadnienie zawartości cukrowców w tumorach roślinnych.

Celem niniejszej pracy było przebadanie zawartości pięciu grup cukrowców w łodygach i tumorach roślinnych *Datura stramonium* L.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał badań stanowiły rośliny *Datura stramonium* L. W momencie wytwarzania przez młode rośliny drugiej — trzeciej pary liści zakażano je *Agrobacterium tumefaciens.*

Kiedy rośliny wytwarzały już dojrzałe nasiona, wycinano z nich do analizy zawartości cukrowców:

1) fragmenty łodyg sąsiadujące z tumorami,
2) tumory.

Przy rozfrakcjonowywaniu cukrowców na poszczególne grupy posługiwano się metodą opisaną przez Biełozierskiego, a cytowaną w poprzedniej naszej pracy (Maciejewska-Potapczyk W., Łukasiak H.).

Do oznaczenia cukrowców poszczególnych frakcji użyto metody Hagedorna Jensena.

WYNIKI DOŚWIADCZEŃ

Wyniki analiz zawartości pięciu frakcji cukrowców łodyg i tumorów *Datura stramonium* ilustruje załączona tabela.

Doświadczenia wykonano na dwu obiektach, a wyniki były zupełnie zgodne.

Jak wynika z tabel, zawartość cukrowców pierwszej frakcji jest znacznie niższa w tumorach niż w łodygach zdrowych. Frakcja druga i trzecia stanowią niewielki procent cukrowców w stosunku do pozostałych frakcji. Zawartość frakcji drugiej jest znacznie wyższa w tumorach, a zawartość frakcji trzeciej jest wyższa w łodygach zdrowych. Zawartość cukrowców frakcji czwartej jest wyższa w tumorach, natomiast zawartość frakcji piątej jest nieco wyższa w łodygach zdrowych.

DYSKUSJA

Frakcja pierwsza to cukry ekstrahujące się 82% etanolem. Występują one głównie w soku komórkowym.

W doświadczeniach niniejszej pracy zawartość tych cukrowców była niższa w tumorach niż w łodygach zdrowych. Wyniki te wydają się potwierdzać pogląd Rackera (cyt. w pracy Greensteina 1959), że przemiana cukrowców w tkankach nowotworowych jest znacznie szybsza niż w tkankach zdrowych. Należy jednak nadmienić, że prace Rackera dotyczyły materiału zwierzęcego. Być może, że spadek zawartości frakcji I

stwierdzony w niniejszej pracy wiąże się nie tylko z szybszą przemianą cukrowców, ale także z upośledzeniem przewodzenia tkankowego. Tkanki przewodzące *Datura stramonium* w miejscach, gdzie wyrastały tumory, ulegały deformacji, co może mieć niekorzystny wpływ na przewodzenie.

Tabela 1 — Table 1

Cukrowce pięciu grup w łodygach i tumorach *Datura stramonium* L.
Carbohydrates of five groups in healthy and tumorous stem tissues of *Datura stramonium* L.

Doświadczenie I
Experiment I

frakcja fraction	Łodygi Stems: zawartość cukrowców w % Carbohydrates content in %		Łodygi Stems: średnio average	Tumory Tumours: zawartość cukrowców w % Carbohydrates content in %		Tumory Tumours: średnio average
I	10.05	10,07	10,06	7,22	7,28	7,25
II	0,81	0,80	0,81	1,90	1,88	1,89
III	4,00	4,30	4,15	2,54	2,55	2,55
IV	35,75	35,83	35,79	43,49	43,55	43,52
V	48,68	49,12	48,90	44,82	44,72	44,77

Doświadczenie II
Experiment II

frakcja fraction	Łodygi Stems: zawartość cukrowców w % Carbohydrates content in %		Łodygi Stems: średnio average	Tumory Tumours: zawartość cukrowców w % Carbohydrates content in %		Tumory Tumours: średnio average
I	10,25	10,21	10,23	16,70	6,98	6,84
II	0,78	0,80	0,79	1,93	1,87	1,90
III	4,20	3,89	4,05	2,36	2,42	2,39
IV	36,08	36,28	36,18	43,76	43,85	43,81
V	48,32	49,62	48,97	45,05	44,99	45,02

Frakcja II to cukry rozpuszczalne w wodzie (estrahowane z materiału wodą). Wartość tej frakcji jest wyższa w tkance nowotworowej.

Frakcja IV i V to cukrowce błon komórkowych. Czwartą frakcję stanowią głównie hemicelulozy i pektyny. Łączna wartość frakcji IV i V jest

wyższa w tumorach o około 5%. Różnicę tę można by chyba tłumaczyć tym, że w tkance nowotworowej, gdzie istnieje szybszy przyrost żywej masy (Maciejewska-Potapczyk W. 1960), wzrasta również masa błon komórkowych. Na skutek szybszych podziałów komórkowych zwiększa się ogólna ich powierzchnia. Wynikałoby stąd, że istnieje pewna zależność między zawartością cukrowców frakcji I a frakcji IV i V: kosztem cukrowców prostych zwiększa się zawartość cukrowców złożonych, jak hemicelulozy i pektyny.

Na podstawie wyników niniejszej pracy nie można wyciągać wniosków o metabolizmie cukrowców w nowotworach roślinnych. Badania te mogą jednak stanowić punkt wyjścia dla przyszłych prac nad przemianami cukrowców w tumorach roślinnych.

STRESZCZENIE

Porównywano zawartość cukrowców w łodygach zdrowych i tumorach *Datura stramonium* L. Oznaczano 5 grup cukrowców: I. jedno-, dwu- i trójcukry, II. dekstryny, śluzy i część substancji pektynowych, III. skrobię, IV. hemicelulozy i pektyny, V. celulozy.

W tumorach stwierdzono niższą zawartość cukrowców grup I, III i V, a wyższą grup II i IV.

Zakład Biochemii
Uniwersytetu Łódzkiego

(Wpłynęło: dn. 10.12.1960 r.)

SUMMARY

The carbohydrate contents in healthy and tumorous stem tissues of *Datura stramonium* L. were compared.

We have determined 5 groups of carbohydrates: I. mono-, di- and trisaccharides, II. dextrines, mucilages and part of pectic substances, III. starch, IV. hemicelluloses and pectic substances, V. celluloses.

The carbohydrates I, III, IV were decreased and the carbohydrates II, IV were increased in the tumors.

LITERATURA

Biełozierski A., Proskuriakow N., 1954, Ćwicz. z bioch. rośl., str. 35 (tłum. z ros.).

Greenstein J., 1959, Chem and Eng. News., 28: 46.

Klein R. M., 1952, Plant Physiol., 27: 335.

Maciejewska-Potapczyk W., Łukasiak H., 1959, Acta Soc. Bot. Pol., 28: 95.

Maciejewska-Potapczyk W., 1960, Łódzkie Tow. Naukowe, wydz. III, Nr 67.

ACTA SOCIETATIS
BOTANICORUM POLONIAE
Vol. XXX — Nr 2
1961

Effect of plant growth regulators on membrane permeability of tomato leaf cells

Wpływ regulatorów wzrostu na przepuszczalność błon komórkowych liści pomidorów

A. CHROMIŃSKI

There are many reports on the effect of plant growth regulators on the rate of transpiration without affecting stomatal behaviour. This has been observed during auxin treatment by different authors (Boysen--Jensen 1935, Player 1950, Michniewicz 1961.

At gibberellic treatment an increase of the cuticular (Sivadijan 1957) and of the total transpiration was observed (Coulombe and Paquin 1959, Michniewicz 1961), however, no effect of gibberellin on the size of the stomatal apertures was found.

It is possible that the changes in transpiration rate in consequence of auxin application are caused by the influence of auxins on the physico--chemical properties of the cell membranes. Some data from literature indicate that such action of auxins is possible (Pohl 1949, 1954, Guttenberg 1955, Müller and Ramshorn 1957).

The lack of correlation between the influence of growth regulators on the rate of transpiration and their influence on stomatal behaviour and also Sacher's (1959) observations show that the causes of changes in transpiration intensity may be traced to the effect of growth regulators on membrane permeability. Sacher's work gives us some indications in this field. He described inhibiting effect of IAA and NAA on the leakage of water and organic and inorganic substances from the leaf cells into the intercellular spaces in *Rheo discolor* and *Mesembryanthemum* sp.

MATERIAL AND METHOD

Tomato leaves of "Karzełek Puławski" and "Mory 33" varieties were used in these experiments. Plants which had been pulled out carefully and washed off rests of soil were put into 5 — 250 ppm solutions of 3-indolylacetic acid (IAA), 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA), and gibberellic acid (GA) and then kept at 25°C in a luminostat chamber regulated to 12 h light during the day.

Table 1

Electric resistance of IAA, TIBA and GA solutions used in treatment (in k ohms × 10)

Solution	Concentration in ppm				
	10	25	50	100	250
IAA	2.545	1.380	0.825	0.538	0.305
TIBA	2.710	2.212	0.926	0.509	0.192
GA	2.235	1.361	0.735	0.431	0.223

Plants treated with IAA and TIBA were examined after 24 h, and in case of treatment with GA after 48 h in order to let GA show its specific effect.

The permeability was determined by means of a conductoscope by the method of Maximov and Vasileva (1949) which was applied later by Vasileva (1953). In this method the permeability is determined on the base of the electric resistance of the solutions obtained by diffusion of low molecular weight substances out of the cells. The electric resistance of these solutions is inversely proportional to the membrane permeability of the cells of the examined tissue.

It can be seen from a comparison of the data shown in Table 1 with those shown in Table 2 that IAA, TIBA and GA solutions used in the treatment of plants have no effect on the electric resistance of the solutions formed as a result of diffusion of organic and inorganic substances out of leaf cells into redistilled water.

The electric resistance of the IAA, TIBA and GA solutions used for the treatment of plants was about 100 times less than the resistance of the dissolved in redistilled water diffusates from the cells.

Therefore, it is obvious that the solutions of the growth regulators had no direct effect on the results of these experiments.

DISCUSSION

The data on the electric resistance of the solutions of the diffusates obtained from tomato leaf cells are shown in Table 2.

It can be seen that IAA in the concentrations from 5 to 50 ppm considerably decreased the diffusion of the low molecular weight substances out of the leaf cells. In spite of the fact that in some experiments the effect of IAA was strongest at various concentrations, this effect occurred within above mentioned limits in nearly 80 per cent of the experiments.

The differences in inhibitory effect of IAA in the particular experiments may be explained by differences in the physiological state of plants, viz., in their age and in the external conditions of plant vegetation prior to the experiments.

Table 2

Effect of IAA, TIBA and GA treatment on membrane permeability of tomato leaf cells (determined as electric resistance in ohms × 100) *

Variety	Age in weeks	Treatment	Concentration in ppm								Significant differences	
			0 (H_2O)	5	10	25	50	100	200	250	P = 0.05	P = 0.01
Karzełek Puł.	4	IAA	3.197	3.557	—	—	**4.660**	3.485	—	—	1.015	1.424
Karzełek Puł.	6		2.190	2.172	—	**2.487**	2.207	—	2.252	—	0.297	0.412
Karzełek Puł.	8		1.720	**2.176**	—	—	**2.400**	1.730	—	—	0.394	0.543
Mory 33	6		2.480	—	**2.918**	—	2.680	—	—	2.544	0.351	0.484
Mory 33	7		1.972	1.876	**2.148**	—	**2.156**	1.916	—	—	0.141	0.192
Mory 33	8		1.590	—	**2.046**	—	1.597	—	—	1.510	0.287	0.396
Karzełek Puł.	6	TIBA	2.132	—	2.072	2.022	2.104	2.166	—	2.010	0.195	0.264
Mory 33	7		1.853	1.910	—	—	1.863	1.921	1.908	—	0.115	0.156
Karzełek Puł.	4	GA	3.316	3.283	—	3.263	—	3.293	3.176	3.279	0.301	0.422
Mory 33	6		2.336	—	2.256	2.342	—	2.382	2.356	2.316	0.119	0.162

* Thick type indicates differences significant at P = 0.05 in comparison with control (zero concentration).
Underlined thick type indicates differences significant at P = 0.01 in comparison with control (zero concentration).

The results of this paper demonstrate that auxin inhibits the permeability of water and of the substances dissolved in it out of the cells into the surrounding medium. These results confirm the data obtained by Sacher (1957, 1959).

It may well be that the inhibition of transpiration by auxins, as the cited authors report, is due to inhibition of water motion from the mesophyll cells into the intercellular spaces of leaves.

No changes resulted when TIBA and GA were applied.

Nicholas Copernicus University
Centre of Applied Biology
Laboratory of Plant Physiology
Piwnice n. Toruń

STRESZCZENIE

Zbadano wpływ kwasu 3-indolilooctowego, kwasu 2,3,5-trójjodobenzoesowego i kwasu giberelinowego na przepuszczalność błon komórek liści pomidorów metodą konduktometryczną opisaną przez Maximowa i Wasiljewą (1949) i stosowaną później przez Wasiljewą (1953).

Stwierdzono, że kwas 3-indolilooctowy obniża przepuszczalność błon komórek liści pomidorów, a kwas 2,3,5-trójjodobenzoesowy i kwas giberelinowy nie wywołują zmian w przepuszczalności.

Powyższe wyniki pozwalają przypuszczać, że obserwowane niejednokrotnie hamowanie transpiracji wywołane działaniem kwasu 3-indolilooctowego spowodowane jest zmniejszaniem intensywności przenikania wody z komórek miękiszu liści do przestrzeni międzykomórkowych.

Otrzymane rezultaty zgodne są z danymi uzyskanymi przez Sachera (1957, 1959). Mogą one wyjaśniać, stwierdzone przez niektórych autorów (np. Michniewicz, 1961), zjawisko obniżania się intensywności i transpiracji w wyniku działania kwasu 3-indolilooctowego, bez wpływu tego związku na stan otwarcia szparek.

LITERATURE CITED

Boysen-Jensen P., 1935, Die Wuchsstofftheorie, Jena. acc. Johansen S., 1954, Physiol. Plant., 7: 531.
Coulombe L. J., Paquin R., 1959, Canad. Jour. Bot., 37, 5: 897.
Guttenberg H., 1954, Huitième Congrès Int. de Botanique: 158, Paris.
Maximov N. A., Vasileva N. G., 1949, Trudy Inst. Fizjol. Rast. im. K. A. Timiryazeva Akad. Nauk SSSR 6, 2: 150.
Michniewicz M., 1961, Acta Soc. Bot. Pol. 1: 133.
Müller E., Ramshorn K., 1957, Flora 145, 1—2: 264.
Player M., 1950 Plant Physiol., 25: 469.
Pohl R., 1949, Planta 36: 230.
Pohl R., 1954, Naturwiss. 41: 392 and 414.
Sacher J. A., 1957, Science 125: 1199.
Sacher J. A., 1959, Plant Physiol., 34, 4: 365.
Sivadijan J., 1957, Bull. Soc. Bot., France 104, 1—2: 40.
Vasileva N. G., 1953, Dokł. Akad. Nauk SSSR 88, 3: 565.

ACTA SOCIETATIS
BOTANICORUM POLONIAE
Vol. XXX — Nr 2
1961

Preliminary results of genetic analysis in *Ascobolus immersus*

A. MAKAREWICZ

G. Rizet gave in 1939 the first indication that *Ascobolus immersus* is a suitable object for genetic studies. In recent years Rizet and his collaborators published some of the results of their work on the genetics of *A. immersus*. (Rizet 1958, et al. 1960, Lissouba et Rizet 1960, Chevaugeon 1959 a, b, c).

A. immersus is a coprophilous fungus of the class *Ascomycetes (Discomycetes, Pezizales, Ascobolaceae)*. The main advantage of this heterothallic fungus is that the ascospores are relatively large and are ejected from the asci in groups of eight. Spontaneous mutations are frequent and affect, among other, the morphology of the ascospores; this enables direct analysis of tetrads. *A. immersus* grows quite easy in laboratory conditions, its developmental cycle is short. The present communication is a preliminary report on the results of experiments so far carried out.

MATERIAL AND METHODS

Experiments have been carried out on strains of *A. immersus* received from Rizet and with his advice and help. I would like to take this opportunity to express my gratitude to prof. Rizet for his kindness *.

In the laboratory the developmental cycle of *A. immersus* lasts about 12 days. The mycelium grew well in an artificial medium according to Yu (1954):

Yeast extract — 0,4%
Agar — 2,5%
pH about 6,3

* Professor Georges Rizet generously permitted our laboratory to benefit from his great experience in this field. Not only did he send us a great deal of his experimental material, but he also helped us in many other ways too: he mailed us many technical instructions of the special methods of culture he employs, and also allowed one of our staff members to study with him for three months. For all the assistance and help he has given us mere formal thanks are too small.

Crosses were made on sterilised horse dung. Beginning from 4 days after crossing the dishes were exposed to light for at least eight hours a day. A temperature of 26°C was maintained, and the air was kept moist. The apothecia emerged after 5—6 days, the ascospores began to ripe after 9—11 days. Beginning with the 9th day the dishes are covered with agar slides (agar — 2,5%) and the slides are changed daily until the 20th or 21st day after crossing. The groups of eight ascospores which are ejected and stuck to the agar slides were analysed under a dissecting microscope. From a single dish, 6 cm. in diameter anything from a few ascospores to a few thousand groups of eight ascospores were found. Rizet's method of germinating the ascospores was used (peptone — 1,25%, agar — 1,25%) but we also alkalised the medium by adding 0,15% of NaOH. On this medium a temperature shock of 39—40°C over a period of 16 hours was applied. In 1923 Schweitzer who used a temperature shock (5—6 hours, 38—40°C) working with *Ascobolus citrinus* growing on rabbit dung explained that this is an adaptation to body temperature and the rabbit's period of digestion. After germination the mycelia were moved to the artificial medium and the next day it was possible to use them for further crossing.

The material used was one wild form and 11 mutants.

A mature ascus of the wild form contains eight violet-brown spores of 50—70 × 30—35 μ. They are stuck together because of the jelly-like substance surrounding them. The whole group of eight ascospores is suspended beneath the upper part of the ascus (Zopf 1880) and at a certain moment is shooted up like a bullet. According to Buller (1909) the force of the shot may carry it to 35 cm.

The mutants used differed from the wild form in the morphology of their ascospores in the following ways:

1) one granular mutant — the pigment of the spores is not smoothly spread, but forms smaller or larger granules (mutant XX);

2) one rough mutant — the membranes of the ascospores are rough (mutant VII);

3) nine white mutants — the ascospores are unpigmented, white (mutants: E, 70, 78, 113, 184, 185, 164, 186 and 131). The numbers of mutants are from Rizet's laboratory.

RESULTS

The results of 74 crosses and the analysis of more than 60 thousand groups of eight ascospores are presented here. The crosses which did not produce at least 300 analysable asci were usually not taken into account.

All the mutants were monogenic in accordance with the findings of Rizet (1960); in crosses with the wild form they gave a segregation of

4 mutants and 4 wild types. The differences between the white mutants were also in agreement with Rizet's findings; they belong to different complex loci, "series", as he calls them. It is quite probable that each different series causes a different blocking of the complex pigment formation process (M. Le Gall 1942). With exception of the crosses: rough × granular and rough × white the results of which were not conclusive it is possible to establish the basic types of segregation in all other crosses. However, in all combinations irregular segregations also appeared.

Regular segregation

a. White mutants × white mutants

Rizet classified white mutants we worked with in the following way:

E	— belongs to one series,
70, 78, 113, 184, 185	— belong to a second series,
164	— „ „ third series,
186	— „ „ fourth, linked with 164,
131	— unclassified.

Crosses: 78 × 113 and 113 × 70 reveal that these three mutants really belong to the same series; not counting rare exceptions, about which we shall speak later, all the asci gave eight white ascospores (symbol — 8:0).

In crosses between mutants from different series many wild recombinants appeared. This means that these mutants are not allelic, that again they do belong to different series. The same applies to the mutant 131: it belongs to some other series.

As far as the relationship between different series is concerned, if they are linked or independent one can assess this by counting the number of different types of tetrads. Table 1 gives the results of nine crosses between mutants belonging to four different series.

There are three types of asci:

8 : 0, parental ditypes (PD) containing two kinds of spores, both parental,

6 : 2, tetratypes (T) with four kinds of spores, two parental and two recombinant,

4 : 4, non parental ditypes (NPD) with two kinds of spores, both recombinant.

To test the independence of the four series from Table 1 Catcheside's (1949) provisory method was employed, two criteria were simultaneously verified: the relationship between PD and NPD and the recombination percent. The first should not deviate from 1 : 1, the second —

from 50%. As one sees in Table 1 all the crosses show independence. The t test was used instead of χ^2 which is usually used.

Table 1 shows deficiency of PD (8 : 0) in crosses: 1, 2, 6, 7, 8 and 9. This deficiency is particularly noticeable because groups of eight white spores appear often, as we shall see later, as a phenotypical modification and an excess of them should be rather expected.

Table 1

Crosses between mutants of different series

Entry no.	Cross	Regular segregation				PD : NPD 1:1		% recomb.
		PD	NPD	T	Total Groups of eight	t	P	
1	186×113	196	258	699	1153	0.8	0.4	52.7
2	E× 70	518	746	1922	3186	2.0	0.05	53.4
3	113×E	527	443	1640	2610	0.9	0.4	48.4
4	186×185	106	83	338	527	0.6	0.5	47.8
5	185×131	69	66	205	340	0.1	0.5	50.0
6	186×131	278	367	1324	1969	1.3	0.2	52.3
7	E×131	564	668	2691	3923	0.9	0.4	51.3
8	E×185	54	66	353	473	0.4	0.5	51.0
9	184×186	420	538	1889	3157	1.2	0.2	48.5
	Total	2432	3235	11061	16338			

To find out, whether or not, this is caused by the fact that in different types of asci the ascospores stick together more or less firmly, in one of the crosses not only the groups of eight, but all the spores were counted. Table 2 shows the results of this counting in 10 samples from cross 184 × 186. When counting only the ascospores deriving from incomplete groups deviations are rarer and smaller than when counting only the complete groups of eight spores; when adding both numbers together the deviations are smaller. However these results do not prove that the ascospores from incomplete groups account for the deficiency of PD in the groups of eight. Perhaps this difference is also accounted for by the fact that certain types of ascospores are ejected more easily depending whether or not they are all mutants, or at least some of them are wild. Anyhow, these results show the necessity of supplementing the results of groups of eight (i.e. tetrad analysis) with the results of all the spores, i.e. random sample method. This will be of the utmost importance during the later stages of work on *A. immersus* when a greater number of known loci and linked groups will enable one to work out genetic maps using more precise

methods of estimating (Papazian 1952, Perkins 1949, 1953, 1955, Barratt et al. 1959, Shult and Lindegren 1956).

In crosses between mutants of different series one observes that the frequency of tetratypes changes during the experiment. All the groups of spores were divided into three successive parts and the percentage of tetratypes was counted in each part.

Table 2

Comparison between tetrad analysis and random sample method

Number of sample from cross 184×186	Complete groups of eight spores				Spores from incomplete groups			Sum of all spores
	PD	NPD	T	Deviation from 1:1 χ^2	white	wild	deviation from 3:1 χ^2	Deviation from 3:1 χ^2
1	7	7	22	0.0	84	41	4.0	1.2
2	11	21	62	3.1	308	118	1.6	4.5
3	50	103	294	18.3	492	159	0.1	13.2
4	46	45	173	0.01	673	230	0.1	0.0
5	53	76	245	4.1	230	76	0.0	3.3
6	29	37	164	1.0	279	67	5.9	0.0
7	45	63	227	3.0	342	123	0.5	3.1
8	49	100	334	17.4	381	94	6.9	7.3
9	77	37	202	14.5	193	62	0.6	12.8
10	52	46	155	0.4	175	44	2.8	4.4
	419	535	1878	14.0	3157	1014	1.6	8.5

Table 3 shows the results of counts made in this way on seven crosses. In all these crosses the percentage of tetratypes increased when comparing the first part with the third, and in six out of the seven an increase was noted when comparing the first part with the average. While statistically the difference was not significant, it was shown, however, that the trend is towards an increase in tetratypes during the period of fructification. As the period of fructification continues the conditions in the medium change, the meiotic divisions which precede the formation of first ascospores happen in different conditions from those in which the last spores are produced. This may perhaps cause the difference in the frequency of crossing-over and therefore in the frequency of tetratypes. Similar findings have been reported many times (e.g. Levine 1956). May be *A. immersus* would prove to be suitable for such kind of studies.

As previously stated mutants 164 and 186 are linked. However, I did not succeed in getting many asci from direct crosses, but a cross: 186 × (164—185) i.e. with a double mutant derived from 164 × 185, produced the following types of asci: PD — 168, NPD — 10, T — 112.

Table 3

Percentage of tetratypes

Entry	Cross	No. of groups of eight spores	Tetratype %			
			first part	second part	third part	average
1	186×113	1158	54.6	63.4	63.6	60.4
2	E× 70	3206	55.4	60.0	65.2	60.0
3	113×E	2630	60.6	62.2	63.2	62.4
4	186×185	527	65.0	61.8	65.6	64.2
5	185×131	341	56.2	56.6	65.6	60.0
6	186×131	1978	65.2	66.8	68.6	67.0
7	E×131	3960	67.6	64.0	73.2	67.8

The great excess of PD over NPD shows linkage; in case of linkage NPD can appear only after four strands double crossing-over.

So far we have dealt only with crosses of white mutants within one series or between different series. We shall now turn to the crosses within the same mutant (between + and —). In such crosses two mutants, namely E and 186 produce a great number of groups of eight of the type 8 : 0, with only white spores. Mutant 164 is quite fertile but gives a very high percentage, up to 13, of asci with wild and granular ascospores. In spite of many attemps I did not succeed in getting apothecia from mutants 113, 184 and 185. The same applies probably to other mutants in this series and to the mutant 131 with which not so many tests were done. These results require further studies for it is not easy to state if the sterility of *A. immersus* is genetic or merely caused by external conditions.

b. White mutants × Granular mutants

A granular mutant was crossed with two white mutants and with one double white mutant. A cross was also made between a double mutant, white and granular, with a wild form. Apart from the white and granular ascospores these crosses produced wild spores, even when neither of the parent was of the wild type. No spores which were both granular and white were found. This seems to indicate that when there is a lack of pigment, one cannot distinguish the pigment granules. The granular mutant may be caused by the fact that the pigment is not evenly spread. Further tests also led to the same conclusion: crosses between granular and white produced double mutants which were both white and granular having a white phenotype.

Comparison between crosses 185 × XX and 164 × XX (Table 4, comb. 1st and 2nd) shows that mutants 185 and XX are rather independent whereas 164 and XX seem to be linked. The last assumption is confirmed by the results of cross wild × (164—XX) (Table 4, 3rd comb.) where the excess of PD over NPD is quite clear and the recombination percent is near to that observed in cross 164 × XX.

In the three combinations mentioned above tetratypes 4 : 2 : 2 (4 white : 2 wild : 2 granular) were found instead of tetratypes 2 : 2 : 2 : 2, because the granular spores when unpigmented are impossible to distinguish from the white ones. In the 4th combination, where a double white mutant is crossed with a granular one, apart from tetratypes 4 : 2 : 2 following tetratypes also appeared:

6 white : 2 granular — 152 asci.
6 white : 2 wild — 116 asci.

Considering the difference between numbers of these two types of asci one may estimate the recombination percent between 164 and XX; if mutants 164 and XX were not linked the numbers should be equal. the existing difference indicates linkage. Assuming the number of 152 asci corresponds to free recombination ($50^{0}/_{0}$) then the number of 116 asci corresponds to $38{,}2^{0}/_{0}$ of recombination, which quite agrees with the results of other crosses from Table 4.

Table 4

Crosses between white and granular mutants

In tables showing segregation types the first number denotes white spores, the second — wild ones
To indicate granular spores the letter „g" is added

Entry no.	Combination	No. of crosses	Regular segregation types							Per-cent re-comb
			4:4g	4:2:2g	4:4	6:2	6:2g	8:0	Total groups of eight	
1	185×XX	1	PD 43	T 119	NPD 49	—	—	—	211	51,4
2	164×XX	4	PD 331	T 528	NPD 89	—	—	—	948	37,2
3	wild×(164–XX)*	6	NPD 297	T 2371	PD 1277	—	—	—	3945	37,5
4	XX×(185–164)**	2	PD 246	T 371	NPD 44	T 116	T 152	T+NPD 360	1282	38,2

Footnotes:

* Indicates a double mutant deriving from cross 164 × XX.

** Indicates a double mutant deriving from cross 185 × 164

Irregular segregation

By irregular segregation it is referred to exceptional tetrads and not to deviations from the expected numbers of different types of asci. In Table 5 one sees that asci irregular as far as pigment content is concerned, appear in all possible groupings of eight spores, namely: 8 : 0, 0 : 8, 7 : 1, 1 : 7, 6 : 2, 2 : 6, 5 : 3, 3 : 5 and 4 : 4. Besides these, asci with granular spores appeared. The different irregularities do not appear with the same frequencies; e.g. asci of the type 8 : 0 are frequent, whilst asci 3 : 5 are very rare. The frequency of irregularities varies in different kinds of crosses; they are often in the cross 164 × 164 and very rare in other crosses of the same combination. An attempt was made to assess the various factors which might cause these phenomena. These may be either mistakes in classification or new mutations. After eliminating these causes a category which needs explanation may be found.

Table 5

Crosses between wild strains

Cross	Regular segreg. 0:8	Irregular segregation						No. of groups of eight	Mut. %
		8:0	5:3	6:2	2:6	with gran. spores	4:4		
wild × wild	443	9				1	1	454	0.2
wild b × wild o	927	28				2	3	960	0.3
wild b × wild i	1592	11	1				16	1620	1.0
wild b × wild p	1390	10					3	1403	0.2
wild b × wild w	332	1		3	2		3	341	1.0
wild b × wild s	705	14		1	1		3	724	0.5
wild 2 × wild i	216	5		1			2	224	1.0
wild b × wild y	127	4						131	0.0
wild b × wild n	1709	12				6		1727	0.0
wild e × wild i	371	12					1	384	0.2
wild m × wild i	271	9						280	0.0
Total	8083	105	1	5	3	9	32	8238	

Misclassifications

Sometimes it is not easy to distinguish a wild but weakly pigmented ascospore from a white one. Occasionally one observes in wild type ascospores a whole gamut of colours, from normal violet-brown to pale pink, these differences occuring both within groups and between them. It seems that the reduced intensity of pigment is caused by an increase in moisture of the medium, however Rizet (1960) states that this may be because

there are also weakly pigmented mutants. However, such difficulties in scoring white and wild ascospores which could lead to misclassifications for instance of the type 6 : 2 instead of 4 : 4 were rare and even then appeared only in certain crosses.

Another cause of errors in classification is the possibility of ascospores from different asci getting joined together. Ascospores not always are ejected together, in groups of eight, sometimes they are in smaller groups or single. This may cause spurious octads which really derive from more than one ascus. The probability of such an event seems to be rather slight, it can, however, explain certain rare exceptions.

Another cause of error is the overlapping of generations. During the early stages of our work on *A. immersus*, when we analysed the dishes up to the end of the fructification, instead as we do now, up to the end of the twenty first day, we often found irregularities. These were: asci with eight granular ascospores, when only one of the parents was granular or eight wild when the expected segregation was 4 : 4. These irregularities were simply caused by the overlapping of generations. Winge (1954) made similar findings in yeasts. Perhaps this explain the rare cases in which asci of the type 0 : 8 were found.

New mutations

In crosses within wild strains new white mutants appear. They are found in asci of the type 4 : 4. In Table 5 where all kinds of irregular segregation found in 11 crosses of different wild strains are shown, the frequency of such mutants may be observed. The percentage of asci in which new mutants appear varies from 0 to 1. This is in agreement with Rizet's (1960) opinion concerning the high rate of spontaneous mutations in *A. immersus*: at the same time the results show that differences may exist between various strains. The granular spores which appeared in these crosses were not tested; it may well be, that they are too new mutations.

Other irregular segregation

As one sees from the above, errors in classification and new mutations could account for all observed types of irregular segregation. However, the frequency of irregularities is sometimes so high that further explanation seems necessary. In Table 6 where the appearance of irregularities in all crosses is presented, one can see the high frequency of type 8 : 0 in almost all combinations. It must be added that in all these combinations where type 8 : 0 is expected, all the asci of that type were classified as

regular. Ascospores from such asci gave often rise to wild strains, which shows, that they present phenotypical modifications. The pigment in the spores appears fairly late on; it is not until just before they are ejected, that one sees pigmented spores in the asci — up to that time they are quite white. Perhaps it is an excess of moisture in the medium which causes them to spring up prematurely; for when there is an excess of moisture the type 8 : 0 seems to occur more frequently.

Another striking point in the Table 6 is the behaviour of mutant 164 when crossed + with — (combination 3). In such a cross the percentage of irregular asci goes up to 13. The most frequent classes of the irregular asci were of the types 7 : 1 and 6 : 2 where the exceptional spores were of the wild type or granular. In the cases when they were tested, they behave according to their phenotypes. It is as yet difficult to account for their origin.

The most remarkable case in Table 6 concerns the crosses: wild × 186 and wild × E, which produce irregulary asci of the types 6 : 2 and 2 : 6 with a frequency of 4 to 6%. Other white mutants when crossed with wild type show a very low frequency of such asci. So far only few of these exceptional asci were genetically tested: a part of them shows segregation 3 : 1 (in asci of the type 6 : 2) or 1 : 3 (in asci of the type 2 : 6), in other normal segregation 2 : 2 was found.

As yet the identity of either six white spores or six wild ones is not proved. It is interesting that the mutants E and 186 are the same which are fertile when crossed within mutants on the contrary to other white mutants we worked with.

DISCUSSION

The two exceptional types, 6 : 2 and 2 : 6, were studied with Rizet's recent findings in mind (Lissouba et Rizet 1960, Rizet et al. 1960, unpublished), These should be presented briefly. When crossing white mutants belonging to the same series, few wild ascospores appear, with the frequency up to 1% in type 6 : 2 asci. In several series the mutants were arranged according to their recombination frequency.

From one of these series 120 asci of type 6 : 2 were genetically tested. The tests showed that it was not conventional crossing-over in either of these asci; no double mutants were found and an uneven number of parental spores appeared in each ascus: 4 were of one parental type ("majoritaire", segregation 2 : 2) and 2 of the second parental type ("minoritaire", segregation 1 : 3). Basing on these facts Rizet assumed that he was dealing with a recombination of conversion type without

Table 6

Irregular segregation

Entry no.	Crosses		No. of crosses	Groups of eight spores total	Regular segreg.	Irregular segregation									
						8:0	0:8	7:1	1:7	6:2	2:6	5:3	3:5	4:4	Wit gra spor
1	wild × wild	between diff. strains	11	8238	8083	105				5	3	1		32	9
2	wild × white	between wild and 70, 78, 113, 185, 164	9	5743	5602	107		1		8	4	6	2		13
		wild × 186, wild × E	8	8590	7687	134	8		1	362	324		2		72
3	white × white within mutant	186 × 186, E × E	5	313[illegible]	3135					1					
		164 × 164	2	1660	1449			117		65		14		7	8
4	white × white within series	78 × 113	1	858	857			1							
		113 × 70	1	1295	1302			2		3					2
5	white × white between series	186 × 113, E × 70, 113 × E, 186 × 185, 185 × 131, 186 × 131, E × 131, E × 185, 184 × 186 164 × 185.	13	17345	17258			3	1	3	2	1	1		76
6	wild × (white-white)	wild × (164 — 185)	2	384	383										1
7	white × (white-white) two mutants	(185 — 186) × 185	1	677	668			8		1					
		164 × (185 — 164)	1	702	712			16		3					1
		(185 — 186) × 186	3	1220	1217					3					
8	white × (white-white) three mutants	186 × (164 — 185)	1	290	290										
9	granular × granul.	XX × XX	1	1118	1100	18									
10	wild × granul.	wild × XX	2	2103	1984	47	42		27			29		19	
11	white × granul.	185 × XX, 164 × XX	5	1221	1159	43				4 11g		2 1g	1		
12	granular × (white-white)	XX × (185 — 164)	2	1289	1282		1				2	2	2		
13	wild × (white-granular)	wild × (164 — XX)	6	4075	3950	117	1			4					
		Total	74	60011	58142										

reciprocal exchange. One may use the following scheme of asci to explain this:

+ a	+ a	
+ a	++	
b +	b +	where b segregates 2 : 2
b +	b +	a segregates 1 : 3
tetrad without conversion	tetrad with conversion	

For each pair of crossed mutants it is always the same mutant which shows segregation 1 : 3 but the same mutant which is "minoritaire" in one cross may be "majoritaire" when crossed with another mutant.

The pattern of segregation can be predicted when knowing the arrangement of mutants, for in every pair the segregation 1 : 3 happens always on the same side. The results agree both when taking into account the recombination frequency and when considering the "minoritaire — majoritaire" relationship.

Apart from the series discussed above Rizet studied other series which revealed two different kinds of asci of the type 6 : 2; one as above and a second which was the product of conventional crossing-over. This shows that the other series are more complex. Basing on these facts Rizet proposed a new genetic unit connected with the peculiar recombination type; this unit he called "polaron" on account of its polarity. Polaron is a polarised linear unit within which recombination is only of the conversion type. Rizet is seeking reverse conversion too, i.e. cases in which segregation would be 3 : 1 more or less according to the following scheme:

+ a	+ a	
+ a	b a	
b +	b +	where a segregates 2 : 2
b +	b +	b segregates 3 : 1
tetrad without conversion	tetrad with conversion	

After such conversion an ascus containing among other ascospores a pair of double mutants would consist of all white spores and it would be therefore impossible to distinguish it without genetic tests. Such asci are not found as yet. To overcome this difficulty Rizet attempted to cross different white mutants with the wild form, looking for asci of the types 6 : 2 and 2 : 6 — and in fact they did appear.

Types 6 : 2 and 2 : 6 which appeared in our experiments were mostly from crosses between wild type and two white mutants: E and 186. Only after additional tests it will be possible to conclude that we are

dealing with a truly genetic change. If this will be proved to be a fact then we could assume a conversion-type mechanism; copy choice without reciprocal exchange. Crossing over can be discarded because after conventional crossing-over we should expect normal 4 : 4 segregation. It is also difficult to conceive of an arrangement of supressors producing such a high and even frequency of types 6 : 2 and 2 : 6.

It is as yet too early for any generalisations and further studies are necessary. It is important to find out what are the differencies between series and between mutants from the same series when crossed with wild type. It is also essential to ascertain, testing the exceptional asci, whether or not the products of the miscopying are really copies of homologous sites i.e. to find out if the six spores, wild or white, are identical. At the same time it is necessary to learn about the life cycle of *A. immersus*, and among other to distinguish between genetic sterility and lack of apothecia caused by external conditions. No less important is the knowledge about the processes prior to the development of asci (Mitchell 1960 a, b).

SUMMARY

74 crosses between 12 strains of *Ascobolus immersus* were performed. The strains we worked with were 1 wild form, 9 white mutants with unpigmented ascospores, 1 granular mutant with granules of pigment on the ascospores and one rough mutant having a rough surface of ascospores. More than 60 000 groups of eight spores were analysed. In the majority of cases regular segregation was stated agreeing and extending Rizet's findings concerning the monogenity of mutants, their division into series and linkage relations. In crosses between white mutants of different series a deficiency of asci of the type 8 : 0 and an increase of the tetratype frequency in time of fructification were observed. In many crosses numerous irregular tetrads are found. After discussing presumable sources of errors, special attention was paid to exceptional asci of the types 6 : 2 and 2 : 6 which arose with a high and even frequency in crosses between two white mutants and a wild form. The possibility to explain these types of asci by conversion is discussed.

I would like to take this oppertunity of thanking Prof. W. Gajewski for all the friendly help he has given me during this work.

Department of General Genetics,
Polish Ac. of Sci. Warsaw, 4 Al. Ujazdowskie, Poland

LITERATURE CITED

Barratt R. W., Newmeyer D., Perkins D. D. and Garnjobst L., 1954, Map construction in *Neurospora crassa*, Advances in Genet. 6.

Buller A., 1909, Researches on fungi. I (after M. Langeron et R. Vanbreuseghem, Précis de Mycologie 1952).

Catcheside D. G., 1949, The genetics of microorganisms.

Chevaugeon J., 1959a, La zonation du thalle, phenomène periodique autonome chez l'*Ascobolus immersus,* Comptes Rendus Acad. Sci., 248: 1381.

Chevaugeon J., 1959b, Sur le determinisme interne du rhytme de croissance chez un mutant "vague" de l'*Ascobolus immersus,* Compt. Rendus Acad. Sci., 248: 1841.

Chevaugeon J. 1959c, Influence de quelques substances sur la manifestation du rythme de croissance chez l'*Ascobolus immersus,* Compt. Rendus Acad. Sci., 249: 1703—1705.

Le Gall M., 1942, Mode de formation des ornamentations sporales chez les *Ascobolus,* Compt. Rend. Acad. Sci., 215: 267.

Levine R. P., 1956, Chromosome organisation and gene recombination, Cold Spring Harb. Symp. XXI.

Lissouba P. et Rizet G., 1960, Sur l'existence d'une unité génétique polarisée ne subissant que des echanges non réciproques, Compt. Rend. Acad. Sci., 250: 3408—3410.

Mitchell M. B., 1960a, Ascus formation and recombination frequencies in *N. crassa,* Genetics 45, 5.

Mitchell M. B., 1960b, Evidence of non-random distribution of ascus classes in fruiting bodies, Genetics 45, 9.

Papazian H. P., 1952, The analysis of tetrad data, Genetics 37,2.

Perkins D. D., 1949, Biochemical mutants in the smut fungus *Ustilago Maydis,* Genetics 34: 607—626.

Perkins D. D., 1953, The detection of linkage in tetrad analysis, Genetics 38, 2.

Perkins D. D., 1955, Tetrads and crossing-over, J. Cell. Comp. Phys. 45, suppl. 2.

Rizet G., 1939, Sur les spores dimorphes et l'hérédité de leurs caractères chez un nouvel *Ascobolus* hétérothallique, Compt. Rend. Ac. Sci. 208: 1669—1671.

Rizet G., 1958, Un nouvel Ascomycète interessant pour les généticiens, *Ascobolus immersus,* Proc. X Intern Congr. Genet. 2: 236.

Rizet G., Engelmann N., Lefort C., Lissouba P. et Mousseau J., 1960, Sur un Ascomycète interessant pour l'étude de certains aspects du problème de la structure du gène, Compt. Rend. Acad. Sci., 250: 2050—2052.

Schweizer G., 1923, Ein Beitrag zur Entwicklungsgeschichte und Biologie von *Ascobolus citrinus,* Zeitschrift f. Bot. 529—556.

Shult E. E. and Lindegren C. C., 1956, Mapping methods in tetrad analysis I, Genetica 28.

Winge O. and Roberts C., 1954, Causes of deviations from 2 : 2 segregations, Compt. Rend. Lab. Carlsberg 25, 11.

Yu C. C., 1954, The culture and spore germination of *Ascobolus* with emphasis on *A. magnificus,* Am. Journ. Bot., 41.

Zopf W., 1880, Die Pilze (after M. Langeron et R. Vanbreuseghem, Précis de Mycologie, 1952).

ACTA SOCIETATIS
BOTANICORUM POLONIAE
Vol. XXX — Nr 2
1961

Porównawcza chromatografia bibułowa kwasów organicznych występujących w korzeniach spichrzowych roślin uprawnych z rodziny baldaszkowatych (*Umbelliferae*)

A comparative paper chromatography of organic acids in storage roots of some cultivable Umbelliferae plants

R. W. SCHRAMM

Kwasy organiczne odgrywają w metabolizmie dużą i wielostronną rolę, wiążąc ze sobą podstawowe jego działy. Rola ich przejawia się wyraźnie zwłaszcza w organizmach roślinnych, gdzie spotykamy bardzo dużą różnorodność jakościową i ilościową w występowaniu poszczególnych kwasów oraz wysoką niejednokrotnie ich sumaryczną zawartość w tkankach (Thimann, Bonner 1950; Davies 1959). W szczególności ważna i złożona jest rola kwasów organicznych w korzeniach, gdzie pośredniczą w pobieraniu i przyswajaniu związków nieorganicznych (Kursanow 1954, 1957). Stąd też coraz częściej spotykamy ostatnio prace nad kwasami organicznymi w korzeniach roślin, przede wszystkim uprawnych, jak marchwi (Lugg, Overell 1948; Overell 1952; Bryant, Overell 1953), buraka cukrowego (Vavruch 1954; Gołowin i in. 1955), dyni (Kursanow, Kulajewa 1957, 1958) i bobiku (Coic, Lesaint 1960).

Rośliny z rodziny baldaszkowatych (*Umbelliferae*), których jadalne korzenie spichrzowe stanowią obok niektórych komosowatych (*Chenopodiaceae*) i krzyżowych (*Cruciferae*) zasadnicze tego typu warzywa, są jeszcze stosunkowo mało zbadane pod względem ilościowej zawartości i jakościowego składu kwasów organicznych. Poza występującymi normalnie we wszystkich tkankach roślinnych takimi kwasami, jak jabłkowy, cytrynowy, bursztynowy, fumarowy, szczawiowy i winowy oraz paru rzadkimi, specyficznymi dla pojedynczych gatunków (Wehmer i in. 1933), znaleziono w korzeniach marchwi z pospolitszych jeszcze kwas mlekowy (Schneider 1941), izocytrynowy (Bryant, Overell 1953) i prawdopodobnie glikolowy (Overell 1952).

Celem niniejszej pracy miało być porównawcze zbadanie na zawartość kwasów organicznych kilku najpospolitszych korzeni jadalnych (jarzyn) z rodziny baldaszkowatych (*Umbelliferae*) przy pomocy chromatografii bibułowej.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiał

Do analiz używano wyciągów z następujących warzyw znajdujących się normalnie w handlu: marchew (*Daucus carota*), pietruszka (*Petroselinum sativum*) i seler (*Apium graveolens*) — wszystkie odmiany bliżej nie określone. Badania przeprowadzono w dwóch seriach: w pierwszej analizowano wyciągi z młodych korzeni zebranych w początku lipca, w drugiej — wyciągi z korzeni starych, już po zakończeniu okresu wegetacyjnego. Porównawczo przeprowadzono również chromatografię wyciągu z tkanki marchwi hodowanej *in vitro* na pożywce Hellera (1952) z dodatkiem 3% sacharozy i 1% agaru, biorąc do analizy czwarte przeszczepienie po wyszczepieniu pierwotnym.

Wzorce kwasów organicznych były preparatami firm Sigma Chemical Company, St. Louis USA, oraz California Corporation for Biochemical Research, Los Angeles USA. Odczynniki do analiz były pochodzenia krajowego.

Przygotowanie ekstraktów tkankowych

Kwasy ekstrahowano z tkanek roślinnych etanolem na zimno według uproszczonej metody opartej na pracy B r y a n t a i O v e r e l l a (1953). W tym celu 6 g świeżej tkanki (3 g w przypadku marchwi hodowanej *in vitro*) oczyszczonej, opłukanej w wodzie destylowanej i osuszonej na bibule, rozcierano z piaskiem kwarcowym w moździerzu z równą ilością 96% etanolu. Po dokładnym zhomogenizowaniu tkanki zadawano ją 40 ml 80% etanolu i macerowano przez 15 minut, często mieszając, a następnie odwirowywano. Supernatant przenoszono do parowniczki i odparowywano w suszarce w temperaturze 60°C, pozostałość podejmowano wodą i ponownie odwirowywano. Tak przygotowany ekstrakt przepuszczano przez silnie kwaśny kationit fenolosulfonowy w formie wodorowej, o pojemności 2 mval/g suchej masy wobec NH_4^+, wyprodukowany w Zakładzie Chemii Ogólnej UAM, oraz anionit nieznanego pochodzenia w formie węglanowej, średnio zasadowy, o pojemności 5 mval/g suchej masy wobec SO_4''. Zatrzymane na anionicie kwasy wymywano 2N węglanem amonu, wyciek odparowywano do sucha w suszarce w tempera-

turze 70°C i pozostałość podejmowano 1 ml wody (0.5 ml w przypadku marchwi hodowanej *in vitro*).

Chromatografia bibułowa

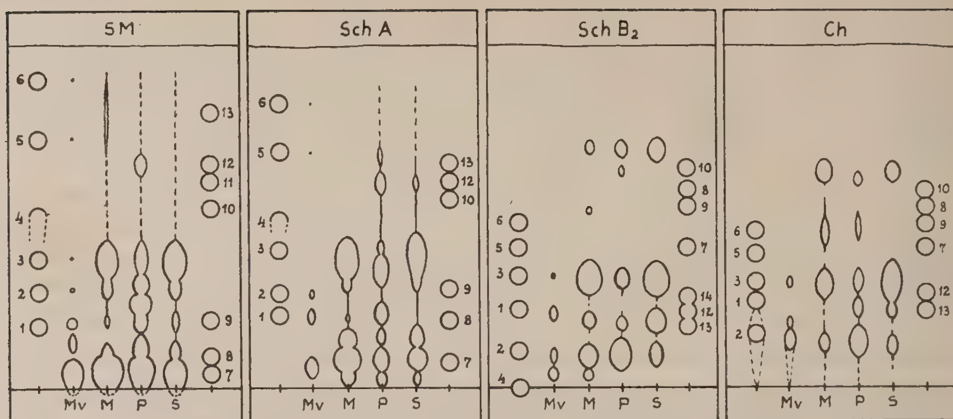
Analizy przeprowadzano drogą chromatografii bibułowej wstępującej w cylindrach (słojach) szklanych na bibule Whatmana Nr 1, metodą opisaną uprzednio (Schramm 1960). Do rozwijania chromatogramów używano alkalicznego rozpuszczalnika Nr 4 (Cheftel i in. 1952) o składzie etanol : amoniak : woda — 75 : 5 : 20 (Ch), eterowego rozpuszczalnika kwaśnego Sołdatienkowa i Mazurowej (1959) eter etylowy : kwas mrówkowy : woda — 18 : 5 : 9 faza eterowa (SM), oraz rozpuszczalników własnych: kwaśnego SchA — n-butanol : octan etylu : woda — 1 : 1 : 1 i alkalicznego $SchB_2$ — etanol : bufor amonowy (1,5 N węglan amonu w 3,0 N amoniaku) 3 : 1 (Schramm 1960), stosując dwugodzinne kondycjonowanie bibuły jedynie w przypadku rozpuszczalnika eterowego (SM). Ekstrakty z tkanek nakraplano w ilości około 10 µl w odległości 3,3 cm od dolnego brzegu bibuły. Rozwinięte i wysuszone chromatogramy wywoływano 0,04% zalkalizowanym roztworem purpury bromokrezolowej w etanolu.

WYNIKI BADAŃ

Wyniki analiz chromatograficznych przedstawione są na ryc. 1 (młode tkanki) i ryc. 2 (tkanki stare, po zakończeniu okresu wegetacyjnego).

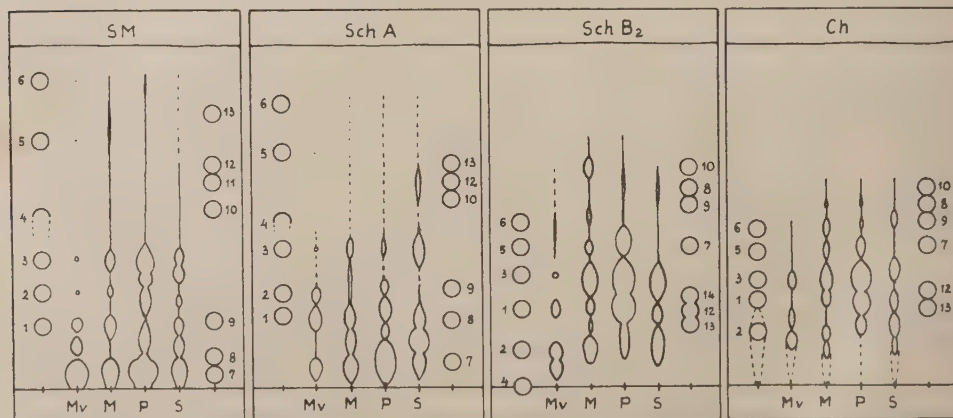
W badanych młodych korzeniach spichrzowych z rodziny baldaszkowatych (ryc. 1) z kwasów uważanych za typowe dla tkanek tego rodzaju występują w nieco większych ilościach jedynie kwas winowy i jabłkowy. Kwas cytrynowy bądź izocytrynowy (Bryant, Overell 1953) pojawia się w ilościach znacznie mniejszych, a kwasy bursztynowy i fumarowy w ilościach śladowych. W dużych ilościach występują natomiast nie zidentyfikowane kwasy, których R_f w rozpuszczalnikach kwaśnych jest bardzo niskie, a w alkalicznych waha się między 0,10 a 0,32.

W tkankach korzeni spichrzowych dojrzałych (ryc. 2) ilościowo dominuje zdecydowanie kwas jabłkowy, w szczególności u marchwi i selera. W sporej ilości pojawiają się również nie występujące w ogóle w młodych tkankach kwasy o wysokich wartościach R_f w rozpuszczalnikach alkalicznych (0,60—0,70); w rozpuszczalnikach kwaśnych lokalizują się one blisko linii startowej. W ekstrakcie ze starych korzeni pietruszki występuje ponadto kwas, którego wartość R_f w rozpuszczalnikach kwaśnych odpowiada kwasowi malonowemu; ustalenie położenia jego plamy na chromatogramie w rozpuszczalnikach alkalicznych jest trudniejsze.



Ryc. 1. Chromatogramy kwasów organicznych z młodych korzeni spichrzowych marchwi (*M*), pietruszki (*P*) i selera (*S*) oraz z tkanki marchwi hodowanej *in vitro* (Mv). Kwasy organiczne używane jako wzorce: *1* — winowy; *2* — cytrynowy; *3* — jabłkowy; *4* — szczawiowy; *5* — bursztynowy; *6* — fumarowy; *7* — glukuronowy; *8* — chinowy; *9* — szikimowy; *10* — glikolowy; *11* — gallusowy; *12* — malonowy; *13* — akonitowy; *14* — glioksylowy. Rozpuszczalniki: SM — eter etylowy: kwas mrówkowy: woda, 18 : 5 : 9 (faza eterowa); SchA — butanol: octan etylu: woda, 1 : 1 : 1; SchB$_2$ — etanol: bufor amonowy 3 : 1; Ch — etanol: amoniak: woda, 75 : 5 : 20. Bibuła Whatman Nr 1, chromatografia wstępująca

Chromatograms of organic acids from young storage roots of carrot (*M*), parsley (*P*), celery (S), and from carrot tissue cultivated *in vitro* (Mv). The samples of organic acids: *1* — tartaric; *2* — citric; *3* — malic; *4* — oxalic; *5* — succinic; *6* — fumaric; *7* — glucuronic; *8* — quinic; *9* — shikimic; *10* — glycollic, *11* — gallic; *12* — malonic; *13* — aconitic; *14* — glyoxylic. Solvents: SM — ethylic ether: formic acid: water, 18 : 5 : 9 (ether phase); SchA — butanol: ethyl acetate: water, 1 : 1 : 1; SchB$_2$ — ethanol: ammonia buffer, 3 : 1; Ch — ethanol: ammonia: water, 7 : 5 : 20. Whatman No. 1 paper, ascending chromatography



Ryc. 2. Chromatogramy kwasów organicznych ze starych korzeni spichrzowych marchwi (*M*), pietruszki (*P*) i selera (*S*) oraz z tkanki marchwi hodowanej *in vitro* (Mv). Oznaczenia jak na rys. 1

Chromatograms of organic acids from old storage roots of carrot (*M*), parsley (*P*), celery (*S*), and from carrot tissue cultivated *in vitro* (Mv). Explanation as in Fig. 1.

Tkanka marchwi hodowanej *in vitro* zawiera małe ilości kwasów winowego, cytrynowego i jabłkowego, ślady bursztynowego i fumarowego oraz pewne ilości kwasów o niskich wartościach R_f we wszystkich rozpuszczalnikach.

DYSKUSJA WYNIKÓW

W porównaniu z innymi roślinami uprawnymi, badanymi na zawartość kwasów organicznych w korzeniach przez różnych autorów, baldaszkowate nie stanowią jakiejś wyraźnie wyodbrębniającej się grupy. Badania prowadzone w naszej pracowni przy pomocy chromatografii bibułowej z zastosowaniem rozpuszczalnika Ch (Kielińska, nie publikowane) wskazują, że sumaryczny obraz chromatograficzny wyciągów z korzeni roślin zielnych dwuliściennych jest, jeśli chodzi o kwasy organiczne, na ogół podobny. Natomiast nawet w obrębie tego samego gatunku, np. u marchwi, mogą wystąpić uchwytne różnice w ilościowym składzie kwasów w zależności od odmiany (Bryant, Overell 1953), a być może także od warunków hodowli.

W niniejszej pracy wystąpiła bardzo wyraźnie zależność składu ilościowego kwasów, a częściowo nawet i jakościowego, od wieku rośliny; różnice w obrazie chromatograficznym ekstraktów z tkanek młodych i starych tego samego gatunku są znacznie większe niż różnice pomiędzy różnymi gatunkami, lecz w tym samym wieku.

Nie wszystkie podawane w literaturze kwasy udało się zidentyfikować na chromatogramach. Kwasy mlekowy i szczawiowy są w ogóle dość trudne do wykrycia drogą chromatografii bibułowej, tym niemniej większe ilości kwasu szczawiowego powinny wystąpić wyraźnie przynajmniej w rozpuszczalniku $SchB_2$. Nie znaleziono również wykrywalnych ilości kwasu glikolowego. Wprawdzie w ekstrakcie z młodych korzeni marchwi pojawia się w rozpuszczalniku $SchB_2$ plama odpowiadająca wartością R_f kwasowi glikolowemu, jednak nie występuje ona na chromatogramach rozwijanych w innych rozpuszczalnikach.

Występujące w dużych ilościach kwaśne związki o niskich wartościach R_f w rozpuszczalnikach kwaśnych, nie były jeszcze dotychczas identyfikowane. Kursanow i Kulajewa (1957) tłumaczą występowanie podobnych plam na chromatogramach ekstraktów z korzeni dyni obecnością sporych ilości kwasów uronowych. Być może, że kwasy te występują również w korzeniach baldaszkowatych; w każdym razie nie jest to jednak na pewno kwas glukuronowy, który w rozpuszczalnikach alkalicznych ma nieco wyższe R_f (0,38—0,40) niż związki występujące

w analizowanym materiale (0,10—0,32). Tego typu kwasy występują przede wszystkim w młodych korzeniach; w starych znajdują się inne kwasy, także jeszcze nie zidentyfikowane, prawdopodobnie również o budowie pierścieniowej, o wysokich wartościach R_f w rozpuszczalnikach alkalicznych. Nie jest wykluczone, że i w starych korzeniach występują w pewnej ilości te same kwasy cykliczne co i w młodych; ich plamy w rozpuszczalnikach alkalicznych mogą być pokryte rozległą plamą kwasu jabłkowego (R_f 0,26 — 0,34). Prawdopodobne jest również występowanie pewnych ilości kwasów chinowego i szikimowego.

Pomiędzy sobą wyciągi z korzeni trzech badanych rodzajów różnią się dosyć znacznie zarówno co do jakościowego, jak i ilościowego składu występujących w nich kwasów. Odnosi się to szczególnie do pietruszki.

Różnice pomiędzy młodymi a dojrzałymi korzeniami spichrzowymi w rodzinie *Umbelliferae* wynikają prawdopodobnie z różnic funkcji fizjologicznych. W młodym wieku rośliny korzeń pełni w znacznej mierze funkcje organu metabolitycznego w stosunku do całego organizmu; z chwilą zakończenia okresu wegetacyjnego natomiast staje się głównie organem spichrzowym dla wtórnego, generatywnego pędu.

Charakterystyczna dla wszystkich dojrzałych korzeni jest wysoka zawartość kwasu jabłkowego, co stwierdzili już B r y a n t i O v e r e l l (1953) dla marchwi. Pod tym względem dojrzałe korzenie spichrzowe baldaszkowatych są bardzo podobne do niedojrzałych nasion, w których również ilościowo przeważa kwas jabłkowy (D u p é r o n 1958), podczas gdy w nasionach dojrzałych, o małej zawartości wody, dominuje kwas cytrynowy.

Tkanka marchwi hodowana *in vitro* ma stosunkowo prosty i ubogi zestaw kwasów organicznych i różni się pod tym względem zdecydowanie od tkanek korzeni spichrzowych z rodziny *Umbelliferae*, nawet od macierzystej tkanki korzenia marchwi. O ile chodzi o rodzaj i ilościowe stosunki kwasów organicznych, zbliża się typem znacznie bardziej do młodych korzeni marchwi niż do starych, aczkolwiek wyszczepienie pierwotne było przeprowadzone w zimie ze starego materiału wyjściowego. Świadczy to o przestawieniu funkcjonowania tkanki hodowanej *in vitro* głównie na czynności metaboliczne.

Chromatografia bibułowa kwasów organicznych, dająca dobre wyniki w przypadku czystych preparatów chemicznych (C a r l e s i in. 1958; S c h r a m m 1960), okazuje się metodą niewystarczającą w przypadku ekstraktów tkankowych, charakteryzujących się dużą różnorodnością kwasów organicznych i bardzo nierównym ich stężeniem. Oczyszczanie wyciągu na kolumnach jonitowych nie uwalnia go od różnego typu składników o charakterze kwaśnym, które powodują niedokładność rozdziału na bibule, nieostrość występujących plam, powstawanie smug itp. oraz

trudności w identyfikacji. Nawet przy równoległym użyciu kilku rozpuszczalników chromatografia bibułowa w czystej postaci może dawać dobre wyniki jedynie w przypadku wyciągów ubogich w składniki kwaśne, jak na przykład tkanki hodowane *in vitro*, natomiast w przypadku wyciągów bardziej złożonych konieczne jest zastosowanie rechromatografii bądź też rozdziału składników na kolumnach anionitowych lub z żelu krzemionkowego z zastosowaniem wzrastającego stężenia mieszaniny eluującej, oraz identyfikacja chemiczna poszczególnych składników.

Dziękuję Sigma Chemical Company i California Foundation for Biochemical Research za bezpłatne próbki kwasów organicznych.

STRESZCZENIE

Przy pomocy chromatografii bibułowej oznaczano kwasy organiczne w oczyszczonych wyciągach z młodych tkanek i starych korzeni marchwi, pietruszki i selera oraz z tkanki marchwi hodowanej *in vitro*. Wszystkie trzy badane rodzaje różnią się między sobą dość znacznie zarówno co do jakościowego, jak i ilościowego składu kwasów. Duże różnice występują między młodymi a starymi korzeniami tych samych gatunków. We wszystkich młodych korzeniach znaleziono kwasy winowy, jabłkowy, cytrynowy lub izocytrynowy oraz ślady bursztynowego i fumarowego. Obok nich występują prawdopodobnie kwasy chinowy i szikimowy oraz kwasy uronowe, a także szereg bliżej nie zidentyfikowanych. Stare korzenie są w ogóle bogatsze w kwasy organiczne; w szczególności występują w nich duże ilości kwasu jabłkowego, zwłaszcza u marchwi i selera oraz nie zidentyfikowane kwasy cykliczne o bardzo małych wartościach R_f w rozpuszczalnikach kwaśnych i dużych w rozpuszczalnikach alkalicznych. Tkanka marchwi hodowana *in vitro* ma znacznie prostszy zestaw kwasów niż tkanki badanych korzeni, zwłaszcza starych. Szczegółowe badania kwasów organicznych w tkankach roślinnych wymagają zastosowania dokładniejszych metod analizy.

Zakład Biochemii
Katedra Fizjologii Roślin
Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Wpłynęło dn. 28.XII.1960 r.

SUMMARY

Organic acids in purified extracts from young and old roots of carrot, parsley, celery, and of carrot tissue cultivated *in vitro* have been investigated by means of paper chromatography technique. The three analysed species of plants differ from each other in qualitative as well as in quantitative content of acids. There are remarkable differences between young and old roots of the same species. In young tissues of all species tartaric, malic, citric or isocitric, as well as traces of succinic and fumaric acids have been found. The possible presence of quinic and shikimic

acids as well as uronic acids is suggested. The old roots are in general much richer in organic acids than the young ones; a large quantity of malic acid is present especially in carrot and celery; some unidentified cyclic acids with a very small R_f value in acid solvents and a rather big one in basic solvents have also been found. The carrot tissue cultivated *in vitro* contains less acids than the analysed root tissues, especially the old ones. Detailed investigations of organic acid contents in plant tissues require more accurate methods of analysis.

Author is very indebred to Sigma Chemical Company and California Foundation for Biochemical Research for the samples of organic acids.

LITERATURA

Bryant F., Overell B. T., 1953, Bioch. Biophys. Acta 10: 471.
Carles J., Schneider A., Lacoste A. M., 1958, Bull. Soc. Chim. Biol. 40: 221.
Cheftel A. I., Munier R., Macheboeuf M., 1952, Bull. Soc. Chim. Biol. 34: 380.
Coic Y., Lesaint C., 1960, C. r. Acad. Sci. 250: 914; Ann. Physiol. Vég. 2: 73.
Davies D. D., 1959, Biol. Revs 34: 407.
Dupéron R., 1958, C. r. Acad. Sci. 247: 342.
Gołowin P. W., Rominskij R., Suszkowa A. S., 1955, Ukr. chim. żurnał 21: 86.
Heller R., 1952, Thèse, Paris, 233 pp.
Kielińska J., nie publikowane.
Kursanow A. L., 1954, Woprosy botaniki, 1: 131.
Kursanow A. L., 1957, a, Izw. Akad. Nauk SSSR, Ser. biol. 689.
Kursanow A. L., 1957, Izw. Akad. Nauk SSSR, Ser. biol. 689; Unesco Intern. Conf. Radioisotop. Sci. Res., Paris, NS/RIC/128.
Kursanow A. L., Kulajewa O. N., 1957, Fizjol. rast. 4: 322.
Kursanow A. L., Kulajewa O. N., 1958, Agrochimica 3: 29.
Lugg J. W. H., Overell B. T., 1948, Austral. J. Sci. Res. A. 1: 98.
Overell B. T., 1952, Austral. J. Sci. 15: 28.
Schneider A., 1941 Planta 32: 234.
Schramm R. W., 1960, Chemia Anal. 5: 1055.
Sołdatienkow S. W., Mazurowa T. A., 1959, Fizjol. rast. 6: 112.
Thiemann K. V., Bonner W. D., 1950, Ann. Rev. Plant Physiol. 1: 75.
Vavruch I., 1954, Chem. listy 48, 442; Sb. Czechosl. chim. rabot 19: 817.
Wehmer C., Thies W., Hadders M., 1932, w G. Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse, 2 Bd, 1 Teil, 496, J. Springer, Wien.

ACTA SOCIETATIS
BOTANICORUM POLONIAE
Vol. XXX — Nr 2
1961

Investigation on the kind of *Larix polonica* Rac. wood formed under various photoperiodic conditions

III. Effect of decapitation and ringing on the wood formation and cambial activity

T. WODZICKI

As shown in an earlier publication (Wodzicki 1961a) photoperiodic conditions may influence not only the extension growth of *Larix polonica* seedlings but also the type of wood and activity of cambium. Thick-walled tracheids were formed after 20 short photoperiods, just after the resting bud was formed at the top of shoot. It was demonstrated, however, that the processes bringing about thickening of cell walls of tracheids are not connected with the photoperiodic reaction of shoot apex but dependent on the photoperiodic treatment affecting full grown needles.

Cessation of cambial activity under influence of short photoperiods was observed between 30 and 40 days after the beginning of treatment. Contrary to the observations made on *Robina pseudacacia* (Wareing, Roberts 1956) it may be supposed that the cessation of cambial activity in larch seedlings is connected with the photoperiodic reaction of shoot apex.

The relationship between the activtiy of cambium and the activity of shoot apex was studied by many authors (Priestley 1930, Priestley, Scott 1936, Söding 1936, Münch 1938, Gouwentak, Maas 1940, Gouwentak 1941, Wareing 1951 and others). Yet, a clear effect of shoot apex activity on the cambial activity was observed only in the initial stage of the latter. It is not clear yet whether there exists any continuous influence of shoot apex on the cambial activity beyond the period of initiation.

This paper comprises the results of research on larch seedlings with reference to this problem, and to the correlation between the kind of wood formed and the activity of shoot apex.

METHODS

Decapitated seedlings and one-year old ringed plants of *Larix polonica* R a c. were investigated. Prior to, or after decapitation or ringing they were submitted to short photoperiods or continuous illumination. The experiments were carried out in a greenhouse, at the beginning of 1959 with incandescent light, 1300 to 1500 lux at night. Detailed data concerning illumination, temperature and air moisture in the grenhouse have already been described by Żelawski (1957) and Wodzicki (1961a). Short day treatment (12 hrs. night) was obtained by putting out the light on one side of the greenhouse and drawing the light-proof courtains. Control series of intact plants were exposed to continuous illumination during the whole time of experiment.

For anatomical examination, transversal sections of stems were cut by hand, stained with safranin and light green and than mounted in Canada balsam for permanent preparations. Cell wall thickness and radial diameter of tracheids were measured and the number of new formed tracheids in radial direction was determined. The method of anatomical examination was similar to that used previously (Wodzicki 1960, 1961a).

Tops of the plants if necessary were cut off together with four to five growing young needles. Thus after decapitation, fully developed needles remained on the plants and possibly one to three upper needles only had completed their growth. A few days after decapitation an enlarged lateral bud-initials in angles of needles appeared. All these buds were being removed every day at the early stage of development. Thus, one to four buds were removed from each decapitated plant, mostly during the first days after decapitation.

One-year old plants were ringed by removing two strips of bark and phloem 1.5 to 2.0 mm wide around the stem in two places 1 to 1.5 cm distant from each other.

The rings were made at 4 — 6 cm below the top of the previous year shoot.

There was one well developed, lateral shoot between the two rings. After the operation, the rings were covered with lanolin.

RESULTS

1. *Influence of Decapitation*

After 60 days of growth under continuous illumination seedlings were divided into four series. Two series of plants were decapitated. One series of decapitated and one of intact plants remained under continuous illumination. The other two

series were submitted to short photoperiods. After 20 consecutive days, short day treated intact plants were further divided into three series. One of them was decapitated and transferred back to continuous illumination together with one series of intact plants (see diagram fig. 1.).

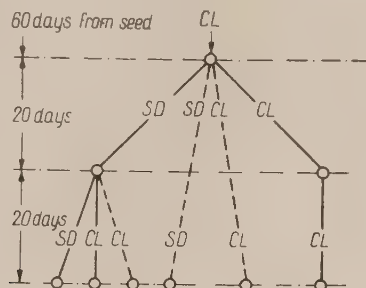


Fig. 1. Diagram of the experiment with decapitated larch seedlings: ———— intact plants; — — — — decapitated plants *CL* — continuous illumination *SD* — short day; —. o.— plants harvested for anatomical examination

Plants were harvested for anatomical examination before the first decapitation, the next time after 20 days (only the control intact plants) and finally after 40 days from all series of plants.

The radial diameter and cell wall thickness of four or six last, fully differentiated tracheids in radial direction along four radiuses (at right angles to one another), were measured. Moreover, along these radiuses, all mature tracheids and living cells in cambial zone were counted.

After 18 to 20 short photoperiods the intact plants formed resting buds. When the plants were subsequently submitted to continuous illumination a visible swelling of the buds was observed. After 40 short days the bud-scales were well lignified and tightly adhered. Intact plants under continuous illumination grew uninterruptedly till the end of the experiment.

The number of tracheids formed after 40 days in decapitated plants was significantly lower than in intact plants, regardless of photoperiodic conditions (Table 1). Cambium of the decapitated plants was dormant. The number of tracheids in these plants increased, but it was not greater than the total number of tracheids and living cells in the cambial zone before decapitation. A fewer number of tracheids has also been observed in intact plants after 20 short photoperiods, however, the absence of differentiating cells in cambial zone (dormant cambium) was observed after 40 short days. The cell wall thickness of tracheids of decapitated plants exposed to continuous illumination was the same as in the control, intact plants. The cell walls of the last two tracheids formed in plants which after decapitation were submitted to short photoperiods, were thicker than of the tracheids formed earlier. They were of the same thickness as in the intact plants under short photoperiods.

Table 1

Influence of decapitation on wood formation in Polish larch seedlings in various photoperiods. Plants grown under continuous illumination before decapitation

(Mean values based on 28 measurements)

Series and period of examination	Number of cells along the radius		Successive tracheids from cambial zone							
			cell wall thickness				radial diameter of tracheids			
	tracheids fully differentiated	tracheids plus living cells in cambial zone **	4	3	2	1	4	3	2	1
At the beginning of experiment	7.2	9.7	microns				microns			
During the experiment										
A. Intact plants										
after 20 days of continuous illumination	10.0	12.5								
after 40 days of cont. illum.	13.5	16.0	2.9	2.9	2.9	2.9	9.8	9.8	10.0	9.7
after 20 short photoperiods	8.9	10.4								
after 40 short photoperiods	10.9	10.9	2.9	3.6	4.3	4.4	9.8	9.9	8.9	8.1
B. Decapitated plants										
after 40 days of cont. illum.	9.3	9.3	2.7	3.0	2.9	2.9	9.9	9.6	8.3	8.6
after 40 short photoperiods	9.8	9.8	2.7	3.0	4.1	4.4	9.6	9.2	8.7	8.0
μ.t	0.7*		0.3				0.9			

* Statistical computations by Snedecor's method, t-test at 5 percent level.

** Without cells of cambial initials layer.

Table 2

Influence of decapitation on wood formed in Polish larch seedlings in various photoperiods. Plants treated with 20 short photoperiods before decapitation

(Mean values based on 28 measurements)

Series and period of examination	Number of cells along the radius		Successive tracheids from cambial zone											
	tracheids fully differ-rentiated	tracheids plus living cells in cambial zone	cell wall thickness						radial diameter of tracheids					
			6	5	4	3	2	1	6	5	4	3	2	1
Before short photoperiod treatment	7.2	9.7												
At the end of experiment														
A. Intact plants	11.5	13.0	3.1	3.5	4.3	4.8	4.6	3.9	9.5	9.1	8.7	8.6	7.6	8.4
B. Decapitated plants	10.4	10.4	2.9	.9	3.1	4.2	5.0	4.7	9.8	9.5	9.9	9.6	8.9	8.3
μ.t	0.8		0.4						0.8					

The mean radial diameter of the last two tracheids of decapitated plants under continuous illumination as well as under short photoperiods was lower than in the tracheids formed earlier and in all intact plants exposed to continuous light. A simillar decrease of the radial diameter of the last tracheids was also observed in intact plants under short day conditions.

It is noteworthy that an essential increase of cell wall thickness in intact plants under short day conditions was ascertained in the third tracheid counting from the cambial zone. A decrease of the radial diameter was first observed in the second tracheid.

Fewer tracheids and the absence of differentiating cells in the cambial zone was observed when the plants were decapitated after 20 short photoperiods (Table 2). Thickwalled tracheids with a smaller radial diameter than in the control plants were also formed.

The cell wall thickness of the last tracheid in intact plants which after 20 short photoperiods were returned to continuous illumination, was smaller than that of earlier formed. The cell wall thickness of last tracheid in decapitated plants remained the same as of the preceding tracheids.

The results show that the removal of the shoot apex together with growing young needles caused the cessation of cambial activity regardless of photoperiodic conditions. The numerical increase of tracheids after decapitation may be due to the completion of the differentiation process in earlier formed cells in cambial zone. Short photoperiods may also induce the cessation of cambial activity and the formation of thick-walled tracheids. These results substantiate earlier observations (Wodzicki 1961a), that the influence of daylength on thick-walled tracheid formation did not depend on the photoperiodic reaction of the shoot apex, and further suggest that the process of radial growth of cells in cambial zone was connected with activity of shoot apex.

2. *Influence of stem ringing*

In order to verify the results obtained with seedlings, further experiments were carried out with one-year old plants by the ringing of stems. This method made it possible to observe the formation of tracheids above the ring influenced by the shoot apex, and under the ring with the growing lateral shoots being below the examined section. Thus, the plant was simultaneously a proper control in itself, which is of great importance considering the variability of the tracheids number in the investigated plants.

The plants grew 82 days under continuous illumination except for one series consisting of 14 plants which during the last 20 days of this period were exposed to short photoperiods. Seven short photoperiod-treated plants and seven plants under continuous illumination were then double-ringed in the above mentioned manner. During the next 20 days all plants were exposed to continuous illumination and then harvested for anatomical examination.

There were, on the average, 14 lateral shoots on each individual plant; usually, either the fifth or sixth or seventh shoot (as from the top of the plant) was situated between the rings (fig. 2). All apical and lateral shoots of the plants under continuous illumination were still growing.

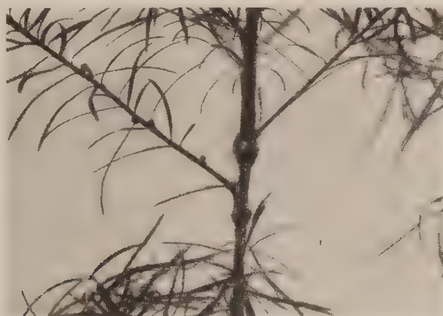


Fig. 2. Double-ringed stem of one-year old larch plant 20 days after the beginning of experiment

Plants exposed to short photoperiods formed resting buds. These buds at the shoots below the ring began to grow at the end of the following period of continuous light treatment, but those above the upper ring only substantially swelled.

The mean number of tracheids running in the radial direction (from the cambial zone to the late wood of previous year) was determined on 20 symetrically situated radiuses in each transversal section of stem in order to eliminate the side effects of irregularites of the stem on the result of experiment.

The natural change in the number of tracheids along the stem was determined by the examination of intact plants grown under continuous illumination at distances of 1 cm, 3.5 cm, 5.2 — 5.5 cm below the base of the new formed main shoot and at 0.5 cm below the cotyledonary node (fig. 3). On the basis of these data it was established that the number of tracheids in the upper part of stem increased basipetally, on the average, 0.5 to 0.6 per 1 cm (Table 3).

The ringed plants were examined at the following height of stem: 1 cm below the base of the new formed main shoot, 1 mm, 1 cm, and 2 cm above the upper ring, 2 mm below the upper and 2 mm below the lower

ring. It was established that the increase of tracheids in these plants per 1 cm downwards the stem was not greater than 0.7 in the following interval: 1 cm below the base of new formed main shoot — 1 cm above the upper ring (Table 3). In the interval 1 cm — 1 mm above the ring, there was an average increase of 5 tracheids down the stem. It may be inferred, therefore, that the significant direct influence of ringing on the numerical increase of tracheids did not extend further than 1 cm above

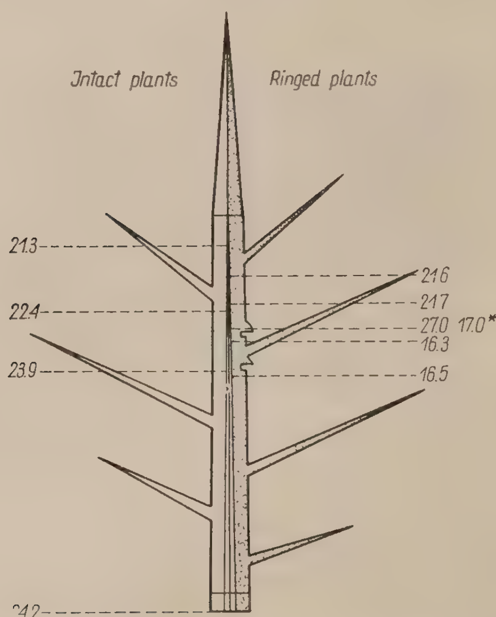


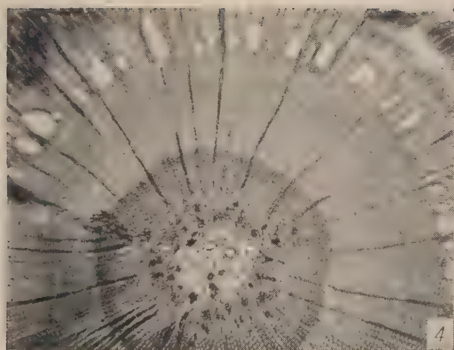
Fig. 3. Number of tracheids at different levels of the stem of intact and ringed plants. (Mean values from seven plants)

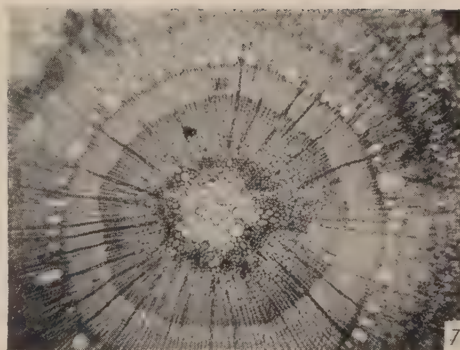
* Number of tracheids between the previous year late wood and a circular belt of wide resin canals.

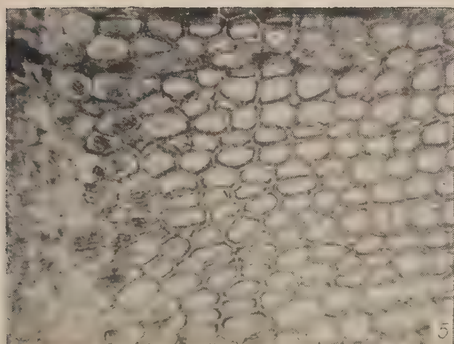
the ring. In order to make certain that the examined section above the ring was situated beyond the swelling caused by the proximity of the ring, the number of tracheids in the sections below rings was compared with the number at a height of 2 cm above the upper ring.

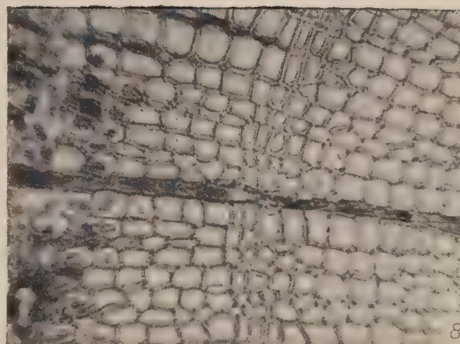
The results are specified in Table 4 and in fig. 3. There were on the average five tracheids less under both the rings than above the upper ring. A circular belt of wide resin canals (fig. 4 and 7) was observed in the section 1 mm above the ring (cutting through the swelling of stem). The number of tracheids between previous year late wood and resin canals was nearly the same as in the sections under the rings (Table 4).

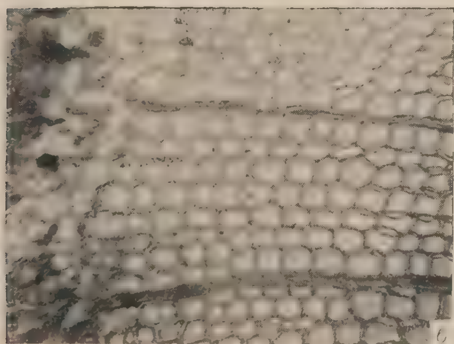
Plate I

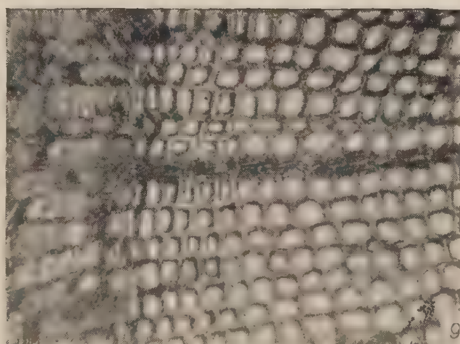












Transversal sections of the stem of one-year old larch plants (Fig. 5, 6, 8, 9, in the same scale)

Fig. 4—6 — Plants under continuous illumination

Fig. 7—9 — Plants under short photoperiods before ringing

Fig. 4, 7 — Sections 1 mm above the upper ring

Fig. 5, 8 — Sections 2 cm above the upper ring

Fig. 6, 9 — Sections 2 mm below the lower ring

Table 3

Downward increment of tracheids in the upper part of stem of plants grown under continuous illumination. (Mean values counted per 1 cm of length of the stem from 7 plants)

Intact plants		Ringed plants	
interval:		interval:	
1 to 3.5 cm	1 to 5.5 cm	1 cm below the base of new formed main shoot to 1 cm above the upper ring	1 mm to 1 cm above upper ring
below the base of new formed main shoot			
0.5	0.6	0.7	5.0

$\mu \cdot t$ 0.5

Table 4

Polish larch plants grown under continuous illumination. Number of tracheids in radial direction at different level of stem of the ringed plants (Mean values from 20 radiuses)

Plants	Number of tracheids at the level: 2 cm above the ring	2 mm below the upper ring	2 mm below the lower ring	Difference between number of tracheids above and belew: upper ring	lower ring	Number of tracheids at the level 1 mm above the ring: from cambial zone to the previous year wood	from the wide resin canals to the previous year wood
1	20.0	17.6	19.9	2.4	0.1	26.1	19.1
2	19.7	16.1	17.2	3.6	2.5	22.4	17.6
3	26.1	18.0	17.3	8.1	8.8	29.8	17.8
4	18.5	12.0	11.4	6.5	7.1	22.8	12.9
5	25.6	21.6	20.7	4.0	4.9	30.4	21.9
6	15.8	11.3	10.5	4.5	5.3	21.7	11.2
7	25.7	17.5	18.6	8.2	7.1	35.1	18.9
Mean	21.6	16.3	16.5	5.3	5.1	26.9	17.0

The cell wall thickness of tracheids above and below the rings of plants under continuous illumination was the same (fig. 5. and 6). Plants which were submitted to 20 short photoperiods before the ringing, formed thick-walled tracheids above and beneath the ring (fig. 8 and 9), but new thin-walled tracheids were formed only above the ring. The layer of thick-walled tracheids was situated just below the wide resin canals, (fig. 7).

The results give ground for regarding the severed connection with the upper part of stem through cambium and phloem as the cause of

cessation of cambial cell division, regardless of photoperiodic conditions. This was also confirmed by a comparison of the mean number of tracheids beneath the rings and the mean number of tracheids between previous year late wood and the circular belt of wide resin canals. This last number is a reliable indication of how many tracheids were formed along each radius just before of ringing.

As in the experiments with decapitated seedlings the influence of photoperiods on the thickening of cell walls was observed. No effect of the ringing on cell wall thickness of tracheids was found.

DISCUSSION

The experiments have proved that the cessation of cambial activity may be induced by decapitation of seedlings or the ringing of older plants as well as short photoperiods after the formation of resting bud. These facts lead to the conclusion that the influence of height growth on cambial activity extends beyond the stage of initiation at the beginnig of the vegetation season (in young Polish larch plants) and continues when the cambium is still active. Therefore, it may be assumed that cessation of the division of cambial cells in the autumn might be also due to the completion of primary meristem activity.

The possible influence of shoot apex activity on cambial activity has already been noted by Priestley and Scott (1936). These authors suggest that in trees in which the extension growth is completed early in summer further activity of shoot apex (under the bud scales *) may affect the activity of cambium.

It is possible that in some deciduous trees activity of cambium may be affected also by the reaction of full grown leaves to photoperiodic conditions, irrespective of the extension growth (investigation on *Robinia pseudacacia* carried out by Wareing and Roberts, 1956). This possibility has not been confirmed, however, in the case of *Larix polonica*. Wareing and Roberts suggested that the leaves under long photoperiods produce more auxins affecting cambial activity. On the basis of many investigations (reviewed by Wareing 1951, 1958, Wodzicki 1961b) it has been assumed that the influence of developing buds on the initiation of cambial cell division depends on the supply of the growth substances to the cambium. It is also known that a growing shoot apex and growing young leaves are a rich source of auxins which are basipetally transported (Went, Thimann 1937). Decapitation or separation by a ring of these parts of plant body caused the cessation of

* This activity leads to formation of next year shoot inititials in bud.

cambial activity. The cessation occured in spite of the presence of growing lateral shoots under the ring beneath the examined place on the stem. It may be inferred from these facts that the cessation of cell division was due to the cutting off the supply of growth substances. Consequently, these substances produced by active primary meristems, and growing leaves would be required for the stimulation of cell division in cambium during the whole period of vegetatin.

This supposition should not necessary be considered contradictory to Söding's (1952) hypothesis which postulates the possibility of auxin formation in the cambium itself. According to this hypothesis, basipetelly transported growth substances stimulate only the growth of the cambial cells laying just below the shoot apex. These cambial cells would produce a new quantity of growth regulators stimulating other cambial cells laying just below. In this way the cambial activity could be observed for a longer period of time than the activity of shoot apex although in the last instance former is dependent on the latter.

Taking into account even the possibility of the existance of such a mechanism of stimulation of cambial activity as postulated by Söding, it may be presumed that the rapid cessation of cell division in cambium, observed in decapitated larch seedlings was due to the short distance between the top of shoot and the examined level on the stem.

The experiments also provide some new data concerning the growth and differentiation of cells in the cambial zone. It was found that the thickening of cell walls might be induced by short day treatment regardless of decapitation or ringing. These operations did not cause any thick-walled tracheid formation when plants grew under continuous illumination. The results suggest that the thickening of cell walls in cambial zone did not depend on the extension growth of larch seedlings. This conclusion is in accordance with the data given by Molski and Żelawski (1958) that the cell wall thickness of tracheids is not related to the photoperiodic reaction of the shoot apex of *Larix decidua*. It also substantiates the results of other experiments (Wodzicki 1961a) which revealed that the thickening of cell walls in the cambial zone depends on the photoperiodic treatment of full grown needles.

As shown by earlier experiments, thick-walled tracheid formation in greenhouse was observed not earlier than after 20 short photoperiods, after the resting bud has alreedy been formed. In natural conditions, thick- walled tracheids were also formed after the resting bud formation (Wodzicki 1960).

All these facts lead to the supposition that thickwalled tracheid formation in larch growing under natural conditions (connected with late wood formation) is controlled by photoperiodic conditions at the end of

the vegetation season, regardless of photoperiodically controlled cessation of extension growth.

A correlation between the thickness of cell walls of tracheids and the width of the differentiation layer of the cambial zone was observed in natural conditions (experiments cited above). The thickness of cell walls was greater when the differentiation layer was wider at the end of the vegetation season. The enlargement of the differentiation layer immediately preceded the appearance of thick-walled tracheids. As this change of width of the differentiation layer required some time, it seems probable that the delay in the formation of thick-walled tracheids under the influence of short photoperiods, observed in greenhouse, was also connected with the incidence of similar changes in the cambial zone. The nature of these changes is not known yet, but possibly there is a relationship between the length of life of differentiating cells in the cambial zone and the thickness of cell wall of tracheids.

The experiments with decapitated and ringed larch plants growing under continuous illumination have also shown that these operations caused a decrease of the radial diameter of tracheids. This fact confirms an earlier assumption that the radial growth of cells after their division in cambium, may be affected by the shoot apex.

The existence of the shoot apex influence upon the radial growth of young cells in the cambial zone, the absence of an influence of shoot apex on the thickening of cell walls, the possible formation of thin-walled tracheids with diminished radial diameters and the absence of a clear marked correlation between the cell wall thickness and the radial diameter of tracheids (Wodzicki 1960) — all these facts lead to the assumption that there is no direct dependence between the radial growth and the thickening of cell walls in the cambial zone. Nevertheless, the two processes may be affected by the same photoperiodic factor. Owing to this fact, the research on the processes leading to early and late wood formation is rather difficult.

Although the above mentioned physiological processes may be only discussed indirectly on the basis of the present experiments, the results cannot be explained by any known hypothesis concerning early and late wood formation (Oppenheimer 1945), Wereing 1958). According to Oppenheimer's hypothesis, late wood is probably formed under conditions of a limited supply of auxins and a large supply of products of assimilation to the cambium. It may be presumed that such conditions occured both in experiments with decapitated and ringed plants growing under continuous illumination as well as in earlier experiments with only the top of the shoot covered (Wodzicki 1961a). None of the plants used in the experiments formed thick-walled tracheids.

although there was a decrease of the radial diameters. This absence of thick-walled tracheids in such conditions cannot be sufficiently explained also by the auxin hypothesis of Wareing (1958).

The fact that the cell wall thickness of tracheids below the upper ring was affected only by photoperiodic conditions regardless of the presence of a well developed lateral shoot between the rings, may possibly point to the absence of direct dependence between the supply of assimilation products and of thick-walled tracheid formation. Preasumably the outflow of assimilates from this shoot to other parts of plants was cut off or considerably limited by two rings (above and below the shoot within the distance of a few milimeters). Therefore, cambium in the sector of the stem neighbouring on this lateral shoot may possibly be supplied better in the products of assimilation. According to Oppenheimer's and earlier, Priestley's (1930) hypothesis, in such conditions late wood (consequently, thick-walled tracheids too) would be formed, but this was not found to be in the case with ringed larch growing under continuous illumination. This argumentation may be accepted with some reservations only, becouse the influence of the ringing on the distribution of products of photosynthesis in the examined part of stem is not known. All these facts, however, point to the necessity of further research on the processes bringing about the annual wood ring differentiation.

In the case of larch seedlings it seems that the radial diameter of tracheids and the duration of cambial activity are related to the activity of primary meristem, and thereby are affected also by photoperiods. The cell wall thickness of tracheids, although affected by photoperiods too, does not depend on the extension growth of the shoot. Finally, it should be recalled that the appearance of thick-walled tracheids also under conditions of water deficit (Wodzicki 1960), shows that the role of external factors in this process may be more complex.

Department of Plant Physiology
Agricultural College S.G.G.W., Warsaw (Entered: 10.I.1961)

SUMMARY

The influence of extension growth on the cambial activity and wood formation in seedlings and one-year old plants of *Larix polonica* Rac. was studied.

The investigations were conducted with decapitated seedlings and ringed plants. Cambial activity in all the decapitated plants ceased, irrespective of photoperiodic conditions. The cessation of cambial activity was also observed 2 mm below a ring made round the stem although under the examined section of the stem, there were growing lateral shoots. Thick-walled tracheids with smaller radial diameter were

formed as a result of short photoperiod treatment regardless of decapitation or ringing. On the other hand decapitation or ringing did not induce formation of thick-walled tracheids in plants under continuous illumination.

The results of experiments and some data concerning previous investigation of the problem were discussed.

REFERENCES

Gouwentak C. A., 1941, Cambial activity as dependent on the presence of growth hormone and the non-resting conditions of stems, Proc. Ned. Akad. van Wetenschappen 44 (5): 654—663.

Gouwentak C. A., Maas M. L., 1940, Kambiumtätigkeit und Wuchsstoff. II, Meded. van de Land. Wag. 44 (1).

Molski B., Żelawski W., 1958, Wstępne badania anatomiczne procesu kształtowania się drewna późnego w słoju rocznym u siewek modrzewia (*Larix europaea* D. C.) w związku z warunkami długości oświetlenia dziennego, Acta Soc. Bot. Pol. 27 (1): 83—102.

Münch E., 1938, Untersuchungen über Harmonie der Baumgestalt, Jahrb. f. Wiss. Bot. 86: 581—673.

Oppenheimer H. R., 1945, Cambial wood production in stems of *Pinus halepensis*, Palestine Journ. Bot. Sci. R. 5: 22—51.

Priestley J. H., 1929/1930, Studies in the physiology of cambial activity. III. The seasonal activity of the cambium, The New Phytologist (4): 317—354.

Priestley J. H., Scott L. I., 1936, A note upon summer wood production in the tree, Proc. Leeds Phil. and Lit. Soc. (Sci. Sect.) 3: 235—248.

Söding H., 1936, Über den Einflus von Wuchsstoff auf das Dickenwachstum der Baume, Ber. Deutsch. Bot. Ges. 54: 291—304.

Söding H., 1952, Die Wuchsstofflehre, Ergebnise und Probleme der Wuchsstofforschung.

Wereing P. F., 1951, Growth studies in woody species. IV. The initiation of cambial activity in ring-porous species, Physiologia Plantarum 4 (3): 546—561.

Wareing P. F., 1958, The physiology of cambial activity, Journ. Inst. Wood. Sci. 1: 34—42.

Wareing P. F., Roberts D. L., 1956, Photoperiodic control of cambial activity in *Robinia pseudacacia* L., The New Phytologist 55: 356—366.

Went F. W., Thimann K. V., 1937, Phytohormones. MacMillan, N.Y.

Wodzicki T., 1960, Investigation on the kind of *Larix polonica* Rac. wood formed under various photoperiodic conditions I. Plants growing in natural conditions, Acta Soc. Bot. Pol. 29 (4); 713—730.

Wodzicki T., 1961a, Investigation on the kind of *Larix polonica* Rac. wood formed under various photoperiodic conditions II. Effect of different light conditions on wood formed by seedlings grown in greenhouse. Acta Soc. Bot. Pol. 30 (1): 111: 131.

Wodzicki T., 1961b, Związek między wzrostem na wysokość i tworzeniem się drewna w świetle badań nad reakcją fotoperiodyczną drzew. Wiadomości Botaniczne 5 (1): 57—72.

Żelawski W., 1957, Dalsze badania reakcji fotoperiodycznej siewek modrzewia (*Larix europaea* D. C.), Acta Soc. Bot. Pol. 26 (1): 80—103.

ACTA SOCIETATIS
BOTANICORUM POLONIAE
Vol. XXX — Nr 2
1961

An attempt to explain the mechanism of the synthesis of α-tocopherol in the seedlings of *Pisum sativum* L.

Próba wyjaśnienia mechanizmu syntezy α-tokoferolu w kiełkach Pisum sativum L.

T. BASZYŃSKI

INTRODUCTION

Green (1958) and Baszyński (1959) put forward the suggestion that α-tocopherol may arise from mono- and dimethyltocols in the process of their methylation.

The universality of the processes of the biological methylation is known both in the animal and in the plant kingdoms. The problem has been, to a great extent, explored by Du Vigneaud and associates who since 1939, working chiefly with animal material, have examined the process of the biosynthesis of the methyl groups, their transfer, degradation and removal from the metabolism.

Work on biological methylation in plants was also undertaken at this time, although the genesis of the methyl compounds, especially in fungi, had been known since the last hundred years or so (Schröter 1955).

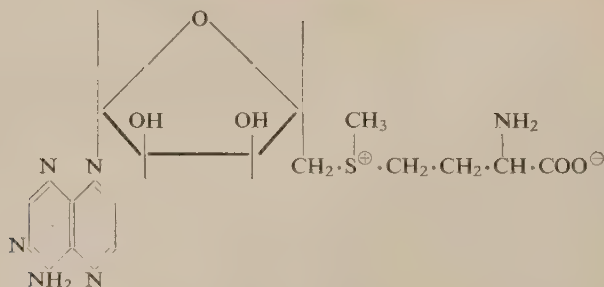
Research on the reactions of methylation in plants was started by Barrenscheen and Pany (1941). These authors stated that in etiolated seedlings of wheat, the enzymatic synthesis of creatine from guanidineacetic acid occurs without any particular donor of the methyl groups.

The genesis of the methyl groups is closely connected with the metabolism of compounds with an ability to split off fragments of C_1 units. The splitting-off of such active groups of C_1 occurs in the oxidation process in the formation of compounds of the formaldehyde type or formic acid. Active groups of C_1 ("formate") may arise from α-glicyne, glioxalic acid, β-serine, methanol, acetone, and certain atoms of the purine system or rings of imidazole histidine (Mothes 1959).

The synthesis of the methyl groups from "formate" require reduction, for which the action of folic acid and its derivates is essential.

From the later work of Du Vigneaud (c.f. Schröter 1958) it appears that methyl groups can be transferred from a donor to an acceptor without oxidation and reduction, and directly, in an unchanged form by the transmethylation reaction. This reaction is not dependent on folic acid but requires special donors of the methyl groups with "onium" structure, and of an unknown transmethylase system.

In many experiments the most active methylating agent in plants appears to be methionine. This compound, does not directly give up $—CH_3$ to the acceptor, but has first to be activated. This activation takes place with the action of ATP catalyzed by the methionine-activating enzyme (MAE) (Cantoni and Durrell 1957). This reaction leads to the formation of the "onium" compound S-adenosyl-methionine (AMe) (Baddiley and Jamieson 1954):



Only then "active methionine" gives up a methyl group transferred by its own methylase to the acceptor.

The methyl groups in plants are transferred above all to sulphur and nitrogen atoms, and also, which has not yet been observed in animals, to oxygen atoms (ricinine, protopine, lignin) (c.f. Schröter 1955).

Among the numerous acceptors of methyl groups mono- and dimethyltocols have not yet been counted, although Schwarz (c. f. Beckmann 1955) supposes that vitamin E may occur in the transmethylation reaction.

This possibility was not taken into consideration probably for two reasons:

(1) the unknown change in the tocopherol composition during the vegetative growth of the plant, which suggests the change of one of the tocopherols into another in the process of methylation or demethylation,

(2) the acceptance of $—CH_3$ by the carbon atom of the acceptor has been known only recently and so far in very few cases.

In 1954 in researches on *Bacillus subtilis* Rege and Sreenivasan showed, that the $—CH_3$ group, derived from glycine, serine, threonine or sarcosine, is substituted in C_5 thymine.

Since Alexander and associates (1958a, 1958b) observed the union of a methyl group to C_{24} in ergosterol of yeast, they assumed that this group derived from methionine is in the course of an unknown process of transmethylation, directly transferred from sulphur to carbon.

Bray and Shemin (c. f. Pawełkiewicz 1959) in their studies on the derivation of additional methyl groups in the corrin ring system of cyanocobalamin, observed the methylation of the carbon atom. They showed that the donor of these groups is methionine. From the experiments of these authors carried out on an *Actinomycetes* culture, it can be seen that the donor was not betaine or choline.

Bukin and Proniakowa (1959) state that the biosynthesis of vitamin B_{12} in *Propionibacterium shermani* is strictly connected with the processes of the methylation of carbon of the corrin ring system under the influence of methionine.

It may be that the transfer of $—CH_3$ to the carbon of the acceptor is not an isolated or an exceptional phenomenon. Because of this the author sets out in this paper to examine in vivo the possibility of the methylation of γ-tocopherol to α-tocopherol using methionine as donor of the methyl groups. If plant tissues control an enzymatic system capable of the synthesis of AMe and a system of transmethylases, one ought to allow the increase in α-tocopherol under the influence of this donor.

MATERIAL AND METHODS

In search for experimental material attention was drawn to the pea (*Pisum sativum* L.) According to Green (1958) peas contain α- and γ-tocopherols as well as insignificant traces of δ-tocopherol. This last disappears after the first day of germination and does not reappear till the beginning of the seed maturation. This is a very favourable circumstance since γ-tocopherol as a dimethyltocol requires the addition of only one $—CH_3$ group for the formation of α-tocopherol. However in the case where δ-tocopherol occurs (mono-methyltocol) one must look out for three products of substitution, which would confuse the interpretation of the results.

Before proceeding to the examination of the mechanism of the synthesis of α-tocopherol the fluctuation undergone by tocols in the germination process of the pea was determined and so also was their relation to the biosynthesis of carotenoids. After the determination of the changes in the composition of the tocopherols occurring in the germination process, research on the mechanism of the synthesis of α-tocopherol was carried

out on 2-day-old seedlings (2—3 cm long) since in this phase of growth they do not yet contain δ-tocopherol, or even traces of it, and are characterized still by a great quantity of tocopherol per unit of fresh matter.

All experiments were carried out in darkness (Baszyński 1959).

In these experiments peas (*Pisum sativum* L.) of the Victoria variety with a germinating percentage of 85 ± 4% were used. Seeds were supplied by the Agriculture Institute in Puławy.

Before germination the seeds were sterilized in a 0,1% of mercuric chloride for 30 minutes, and were than washed in distilled water.

Germination took place in a thermostat at a temperature of 28 ± 3°C on lignin moistened with distilled water.

For experiments on the number of changes of particular tocopherols in 7 days'growth, the seeds were kept on paraffinated gauze in Knop's five-times-dissolved nutrient solution. Material for analysis was collected after 1, 2, 3, 4, 5 and 7 days.

Methylation was carried out in 2-day-old cut seedlings in vivo by the infiltration method. Each time, 20 g of seedlings were taken for one estimation. Infiltration was carried out in a vacuum dessicator in beakers containing 100 ml of buffer solution with corresponding substrate. Air was removed from the dessicator by means of a vacuum pump, pressure was diminished to 40 mm Hg. After 30 minutes the tap was turned off, the pump was disconnected and pressure was restored in 2 minutes. After a quick and thorough rinsing with water the material was placed in Petrie dishes and put in a draught at a temperature of 30°C to drive off excessive water and to return the weight of the seedlings to the original state. Then they were put in dessicators (with open tube) and incubated in a thermostat at a temperature of 28 ± 3°C. Relative humidity in the dessicator was 85—90%.

The seedlings were incubated for 2, 10, and 20 hours. After the determination of the optimal time of incubation (10 hours) this time was adapted in all succeeding experiments.

As donor of the methyl groups, D,L-methionine (The British Drug Houses Ltd.) was always used, in the presence of ATP and magnesium ions. In the determination of the optimal concentration of methionine, it was used in concentrations of 0,02; 0,1 and 0,25 M. In all remaining experiments methionine was used in the concentration 0,1 M.

Adenosinetriphosphoric acid (The British Drug Houses Ltd.) was at first used in concentrations of $1 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-3}$, and $5 \cdot 10^{-3}$ M, and later $1 \cdot 10^{-3}$ M.

$MgCl_2$ A. R. (FOCH Gliwice) was used in the concentration 0,02 M.

All experiments were carried out in a phosphate buffer at 0,02 M,

at pH 6,6. In the determination of the optimal concentration of hydrogen ions, phosphate buffer at 5,6 and 7,8 was used in addition.

All experiments were compared with a control (buffer, not containing substrates).

The biosynthesis of α-tocopherol was measured by the increase of this compound per unit of dry matter depending on time of incubation, the pH of the medium and the concentrations of methionine and ATP.

Tocopherols were estimated by Green's method, accepted by the British Analytical Methods Committee (1959).

The shoots were finely chopped in the Multi-Mixer homogenizer and prepared for chromatography according to the methods used in a previous paper by the author (1959). The unsaponifiable fraction was dissolved in benzene and chromatographed on a column filled with florisil activated according to the method of Glavinde, Kjelhede and Prange (c. f. Brown 1952). After paper chromatography the extinction of the eluate was measured on a Colleman photocolorimeter by the 8—209 filter (525 mμ). The identification of the tocopherol was made on the basis of the R_f and checking maximum absorption after eluating on filter paper in a spectrophotometer SF 4.

Carotene and xanthophyll were estimated by Worker's method (1957).

The results shown in the tables are arithmetical means of five repetitions.

In all statistical counts, Student "t" method was applied; only in tables 4 and 5 the influence of the concentration of the substrate (methionine and ATP) was determined by Fisher's method.

In the tables the value of the confident interval was calculated with a 5% standart error only in cases where there was a real influence of this factor ($t^0 > t_{0,05}$; $F^0 > F_{0,05}$).

RESULTS

1. Content of tocopherols in the germinating pea seed and quantitative changes in their composition

In etiolated shoots of the pea, tocopherols occur in significant quantities. The total content of tocopherols calculated on the basis of dry matter falls in the period of growth. After seven days it is 40,3% of what it was on the first day of germination. The absolute content of tocopherols (in 10 seedlings) at first rises insignificantly and from the third day of germination a fall in tocopherol content can be observed until the end of the seven-day experiments.

Table 1

Content of tocopherols and carotenoids in seedlings of *Pisum sativum* L. growing in darkness

Day of growth	Dry matter %	Tocopherols												Carotenoids in µg					
		per g of fresh weight							per g of dry weight	in 10 seedlings				per g of fresh weight		per g of dry weight		in 10 seedlings	
		α		γ		δ		total	total	α	γ	δ	total	carotene	xanthophyll	carotene	xanthophyll	carotene	xanthophyll
		µg	%	µg	%	µg	%	µg	µg	µg									
1	30,4	6.6 ±0.10	12.1	45.5 ±0.45	83.1	2.6 ±0.10	4.8	54.7	179.9	0.5	3.4	0.2	4.1	—	-	—	—	—	—
2	19.9	10.4 ±0.97	32.4	21.2 ±2.14	67.6	traces		31.6	158.9	1.5	3.2	—	4.3	traces					
3	17.2	11.2 ±0.40	42.3	15.0 ±0.23	57.7	—	—	26.0	151.2	1.7	2.3	—	4.0	traces					
4	14.7	12.0 ±0.70	58.2	8.6 ±0.77	41.8	—	—	20.6	140.2	2.2	1.6	—	3.8	0.1 ±0.02	0.4 ±0.08	0.7	2.7	0.03	0.13
5	10.6	8.8 ±0.67	65.7	4.6 ±0.36	34.3	—	—	13.4	126.8	2.2	1.2	—	3.4	0.2 ±0.01	0.4 ±0.07	1.9	3.8	0.5	1.0
7	6.3	3.7 ±0.55	80.4	0.9 ±0.17	19.6	—	—	4.6	72.4	2.3	0.6	—	2.9	0.5 ±0,05	0.6 ±0.12	6.3	9.5	1.5	2.3

Etiolated pea seedlings contain three tocols (α, γ, δ). δ-Tocopherol forms the smallest percentage of the total tocopherols (4,8%); on the second day only slight traces can be observed. With further growth δ-tocopherol disappears completely. Changes in tocopherol content involve diminution of the amount of γ-tocopherol (from 83,1% on the first day of germination to 19,6% after seven days) and augmentation of the amount of α-tocopherol (to 80,4% on the last day of the experiments) (see table 1).

At first carotenoids do not appear at all. Only traces of these compounds can be observed on the second and third days of the experiments. The first measurable quantity of carotenoids was observed on the fourth day of germination. The biosynthesis of carotenoids occurs more and more intensively as the seedlings develops. During the whole period of the research there is more xanthophyll that carotene. The biosynthesis of carotene occurs more quickly than that of xanthophyll: this can be seen in the change of the relation of xanthophyll to carotene reaching 4,0 on the fourth day of the experiments and 1,5 after seven days.

2. Dependence of the synthesis of α-tocopherol on the incubation-time of the seedlings

Since there were no data on the speed of the synthesis of α-tocopherol in pea-shoots, an analysis was carried out 2, 10, and 20 hours after the time of infiltration (table 2). A suitable time had to be chosen in which a fall in the total of tocopherols would not occur, and the increase of α-tocopherol was as big as possible. Infiltration by buffer alone had no real influence on lowering the total of tocopherols after 2 hours, and only to a very slight degree after 10 hours. However, after 20 hours the decrease in total of tocopherol is very significant, reaching 1/3 of what it was in the beginning.

Infiltration with methionine (+ATP and Mg^{++}) also did not affect the total of tocopherols in the first two periods of incubation, and the decrease after 20 hours is also very significant.

The content of α-tocopherol after infiltration of the seedlings with buffer (without methionine) scarcely changes after 2 hours; 10 hours of incubation causes a rise in the amount of α-tocopherol, while 20 hours'incubation caused a big fall in the amount.

Methionine in comparison with the sample before infiltration in the two first cases raised the quantity of α-tocopherol in proportion to the time of incubation. After 20 hours'incubation methionine causes a decrease of this compounds. In comparison with the control methionine gives higher results in all cases.

Table 2

Effect of incubation time on the synthesis of α-tocopherol

	Before infiltration	After infiltration					
		2 hours		10 hours		20 hours	
		C	S	C	S	C	S
Total of tocopherols in μg/1 g of dry matter	144.0	141.8	142.5	140.2	139.2	51.5	61.6
Increase after incubation		—2.2	—1.5	—3.8	—4.8	—92.5	—82.4
confident interval		—	—	3.83	4.62	12.88	9.78
Increase under the effect of methionine for the given time of incubation		0.7		—1.0		10.1	
confident interval		—		—		—	
α-tocopherol in μg/1 g of dry matter	55.8	55.3	59.3	61.2	70.4	31.1	41.2
Increase after incubation		—0.5	3.5	5.4	14.6	—24.7	—14.6
confident interval		—	—	2.91	4.58	8.20	7.40
Increase under the effect of methionine for the given time of incubation		4.0		9.2		10.1	
confident interval		—		2.29		9.52	
% of α-tocopherol	38.7	39.0	41.5	43.6	50.6	60.5	66.8
Increase after incubation		0.3	2.8	4.9	11.8	21.74	28.04
confident interval		—	1.9	1.4	2.9	2.8	3.3
Increase under the effect of methionine for the given time of incubation		2.66		6.92		6.30	
confident interval		2.42		2.04		1.40	

In each sample infiltrated 20 g of etiolated pea seedlings in 100 ml 0.02 M of phosphate buffer: *C* — control; *S* — sample containing 0,1 M D,L-methionine, $1 \cdot 10^{-3}$ M ATP, 0.02 M $MgCl_2$ in solution. Time of incubation respectively 2, 10, 20 hours.

The percentage content of α-tocopherol increases in all three combinations. The most marked influence of methionine on the synthesis of α-tocopherol was achieved 10 hours after the time of infiltration Essential differences also occur after 2 and 20 hours. Although the greatest percentage increase of α-tocopherol occurred after 20 hours incubation. this experimental variant was not applied in further experiments because of the considerable decrease in the total of tocopherols.

3. Influence of the pH on the synthesis of α-tocopherol

In order to follow the synthesis of α-tocopherol in relation to the pH of the medium and to determine the optimum pH for the synthesis, phosphate buffers of pH 5,6; 6,6 and 7,8 were used for infiltration. Having regard to the significant buffering properties of plant cells, in the choice of suitable concentration of hydrogen ions, the author attempt to apply a relatively wide scale of pH. The results of this series of experiments can be seen in table 3.

The total amounts of tocopherols in infiltrated pea seedlings after 10 hours of incubation undergoes a slight decrease for all tested pH values. This applies as much to the samples infiltrated with buffer alone as to those with methionine.

The content of α-tocopherol increases after infiltration for all pH values used, both in samples without methionine and in those with methionine. There are statistically important differences in the content of α-tocopherol for pH 5,6 and 6,6, while for pH 7,8 there are no essential differences.

The increases of α-tocopherol after infiltration without methionine reach. correspondingly 4,3 μg, 6,4 μg, and 1,5 μg, with the increasing pH values. In comparison with the state before infiltration this is 8,3%, 12,4%, and 2,8%.

After infiltration with methionine these increases are markedly higher and reach 6,7 μg. 17.5 μg, 1,9 μg correspondingly, which is 13,8%. 33.8%, and 3,7%.

These figures shown that the greatest increase in α-tocopherol is achieved at pH 6.6. when the sample infiltrated by methionine gives an increase 2,7 times greater than the control (without methionine).

The percentage content of α-tocopherol in relation to the total of tocopherols is also highest at pH 6,6.

4. Effect of the methionine concentration on the synthesis of α-tocopherol

As can be seen from table 4. the content of the total of tocopherols in 1 g of dry matter in seedlings infiltrated by various concentrations of

Table 3

Effect of pH on the synthesis of α-tocopherol

	Before infiltration	After infiltration and incubation					
		pH					
		5,6		6.6		7.8	
		Concentration of methionine in M					
		0	0.1	0	0.1	0	0.1
Total of tocopherols in µg/1 g of dry matter	144.1	142.1	141.0	141.4	140.3	140.9	140.0
Increase after infiltration and incubation		—2.0	—3.0	—2.7	—3.8	—3.2	—4.1
confident interval		—	2.18	1.69	—	—	3.90
Increase under the effect of methionine at a given pH		—1.0		—1.1		—0.9	
α-tocopherol in µg/1 g of dry matter	51.8	56.1	58.5	58.2	69.3	53.3	53.7
Increase after infiltration and incubation		4.3	6.7	6.4	17.5	1.5	1.9
confident interval		2.64	4.08	4.34	4.71		
Increase under the effect of methionine at a given pH		2.4		11.1		0.4	
confident interval		—		3.00		—	
% of α-tocopherol	36.0	39.6	41.5	41.2	49.5	37.8	38.4
Increase after infiltration and incubation		3.6	5.5	5.2	13.5	1.8	2.4
confident interxal		1.7	2.7	3.1	4.0		
Increase under the effect of methionine at a given pH		1.9		8.3		0.6	
confident interval				3.00			

In each sample infiltrated 20 g etiolated pea seedlings in 100 ml 0,02 M of phosphate buffer at pH respectively 5,6, 6,6, 7,8. Samples with D, L-methionine (0,1 M) contain $1 \cdot 10^{-3}$ M ATP and 0,02 M $MgCl_2$. Time of incubation 10 hours

methionine differs slightly from the amounts of these compounds before infiltration. These differences are chance differences except for the concentration 0,02 M of methionine.

The concentration of the methionine plays a part in the synthesis of α-tocopherol and has a real effect. The biggest increase of the compound

Table 4

Effect of methionine on the synthesis of α-tocopherol

	Before infiltration	After infiltration and incubation: concentration of methionine in M				Effect of dosages of methionine
		0	0.02	0.10	0.25	Confident interval
Total of tocopherols in μg/1 g of dry matter	149.5	147.4	143.5	146.7	142.7	3.32
Increase after infiltration and incubation		—2.1	—6.0	—2.8	—6.8	
confident interval		—	5.63	—	—	
α-tocopherol in μg/1 g of dry matter	52.2	61.1	61.8	69.6	63.1	1.51
Increase after infiltration and incubation		8.9	9.6	17.4	10.9	
confident interval		2.47	1.77	1.70	2.88	
% of α-tocopherol	34.9	41.6	43.2	47.5	44.3	1.40
Increase after infiltration and incubation		6.7	8.3	12.6	9.4	
confident interval		2.19	2.31	2.10	2.07	

Infiltrated 20 g etiolated pea seedlings in 100 ml 0.02 M phosphate buffer containing D, L-methionine (0; 0,02 0,1; 0,25 M) + $1 \cdot 10^{-3}$ M ATP + 0,02 M $MgCl_2$. Time of incubation 10 hours.

was observed at 0,1 M of samples infiltrated without the addition of methionine increased itself nearly twice over, forming 33,3% in relation to the quantity of α-tocopherol before infiltration.

Taking the percentage content of α-tocopherol into account against the background of the total of tocopherols, it can be shown that the increase in the synthesis of α-tocopherol is related to concentrations of methionine in the order

$$0 < 0,02 < 0,25 < 0,1 \text{ M}.$$

5. Effect of ATP on the synthesis of α-tocopherol

Treating the synthesis of α-tocopherol as a result of the methylation of γ-tocopherol, a check had to be made to find whether ATP, which is

Table 5

Effect of ATP on the synthesis of α-tocopherol

	Before infiltration	After infiltration and incubation					
		control	0.1 M Methionine				
			concentration ATP in M				Efect of APT dosage
			0	$1 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	confident interval
Total of tocopherols in μg/1g of dry matter	145.0	144.9	142.7	141.5	139.9	139.9	—
Increase after infiltration and incubation		—0.1	—2.3	—3.5	—5.1	—5.1	
confident interval		—	—	—	—	—	
Increase under the effect of methionine with various dosages of ATP			—2.2	—3.4	—5.1	—5.0	
confident interval			—	—	3.7	3.6	
α—tocopherol in μg/1g of dry matter	53.5	61.1	64.7	72.0	68.6	65.9	1.78
Increase after infiltration and incubation		7.6	11.2	18.5	15.1	12.4	
confident interval		2.66	3.67	4.70	5.43	5.41	
Increase under the effect of methionine with various dosages of ATP			3.6	10.9	7.5	4.8	
confident interval			2.46	3.87	4.60	4.25	
% of α-tocopherol	36.9	42.2	45.4	51.0	49.1	47.2	1.90
Increase after infiltration and incubation		5.3	8.5	14.0	12.2	10.3	
confident interval		2.7	3.0	4.8	5.1	5.1	
Increase under the effect of methionine with various dosages of ATP			3.2	8.8	6.9	5.0	
confident interval			2.0	3.4	3.7	3.1	

Infiltrated 20 g of etiolated pea seedling in 100 ml 0.02 M phosphate buffer. In the case of using 0.1 M D, L-methionine ATP was used in the concentrations 0; $1 \cdot 10^{-3}$; $2 \cdot 10^{-3}$; $5 \cdot 10^{-3}$ M. Time of incubation 10 hours.

the methionine-activating agent, has an effect on this process. The results of this series of experiments are to be seen in table 5.

From them it appears that the infiltration lowers the total of tocopherols in all combinations. Comparing the addition of ATP and methionine with the control, a reduction in the total of tocopherols is observed. In two cases out of three, where the ATP concentration reaches $2 \cdot 10^{-3}$ M and $5 \cdot 10^{-3}$ M a marked decrease in tocopherols is noticed.

As regards the samples before infiltration the differences in the total of tocopherols could arise accidentally.

The content of α-tocopherol increases in all samples in comparison with the amount before infiltration, and the results are statistically significant; the differences between the α-tocopherol content in samples infiltrated with various concentrations of ATP and methionine, and the control (infiltration with buffer alone), are also borne out by statistics. The most intensive synthesis of α-tocopherol is indicated at $1 \cdot 10^{-3}$ M.

This also refers to the percentage increase in α-tocopherol content. The results mentioned indicate that ATP is an important factor in this synthesis and has essential effect.

DISCUSSION

The synthesis of tocopherols in the pea during its period of germination was examined fragmentarily (Zacharowa 1954, Green 1958). The experiments carried out by me on the quality and quantity of tocopherols in the first days of germination at daily intervals have not been described in literature.

During the peas'growth the synthesis of the tocols increases for the first three days and then goes in decreasing as far as the absolute amount of these compounds is concerned. Zacharowa, however, has reported an increase in tocopherol content in the germinating pea throughout the whole 20-days-period of her experiments. The method used by Zacharowa to estimate tocopherols did not permit the separation of non--tocopherol reducing substances, of which there are a relatively considerable number in the pea. Thus we do not know if this increase refers to tocopherols or also to these reducing substances.

Chattophadyay and Banerjee (1952) observed increase in the synthesis of tocopherols in leguminous and cereal plants during germination. The same objections as were made in Zacharowa's case may be applied to the work of these authors too, because of the method used.

The results here obtained show a greater correspondence with Green's work (1958). This author also observed a tendency to decrease

in the total of tocopherols, after the initial increase. A comparison of results leads, however to certain difficulties because of the different conditions of germination, such as temperature, humidity, and (connected with it) the different rate of growth of plants.

In Green's experiments, the increase of total tocopherol content was visible still on the fourth day of germination, while in mine a decrease began on the third day. It should be mentioned that 3-days-old seedlings in my experiments were about 3 cm long, while in Green's this phase of growth was reached on the 8th day, and in this time the decrease in tocopherol content is also marked in the experiments of that author.

My researches confirm Green's results as to the occurrence of three tocols in the pea (α, γ, δ). δ-Tocopherol was found in traces by him in the whole 8-days-period of observation. It was not possible to discover it after the second day of germination in my experiments, but it should be remembered that the analysed plant material had reached a later stage of development than Green's seedlings at his time.

During the time of the experiments synthesis of α-tocopherol and percentage increase in content were noted. After 7 days, α-tocopherol formed 80,1% of the tocols present. This value also departs from Green's, although in my experiments 7-days-old seedlings were 10—12 cm long and have had the first pair of leaves, while in Green's 8-days-old plants were scarcely 3 cm long.

In the field experiments carried out by Green such a percentage of α-tocopherol was reached after 21 days.

There is no possibility of comparing my results with Green's data on the basis of days of germination. The only course is to compare the phase of growth of the plant and correlate the results to this.

The synthesis of tocopherols, when the seedlings are germinating in darkness, diminishes. This may be connected, on one hand with the using-up of the phytol in the etiolated plant, which is vitaly necessary for the synthesis of tocopherol, and on the other with the increase in synthesis of carotenoids — the probably rivals of the tocopherols for the phytol. The second possibility seems more likely since the tocopherol total decreases systematically with the appearence of the carotenoids. Such an absolute decrease of tocopherols has not been observed in maize (Baszyński 1959).

It appears that α-tocopherol arises from γ-tocopherol. The decrease of γ-tocopherol brings an even more marked increase in α-tocopherol than in maize.

Thus etiolated pea seedlings are more suitable for research on the

biosynthesis of α-tocopherol as a process of the methylation of mono- and dimethyltocols, than maize.

Since in the first days of growth I did not observe essential differences in the total amount of tocopherols, whereas the percentage content of α-tocopherol markedly rose with the growth of the pea, the process of transmethylation most probably took place. When I began my experiments, this type of reaction based on the AMe synthesis was well known in vertebrates (Cantoni 1956), and had recently been noted in micro-organisms also (Mudd and Cantoni 1958, Schlenk, Dainko and Stanford 1959).

The optimum incubation time of infiltrated seedlings for the synthesis of α-tocopherol, as recorded by me, is 10 hours. This times agrees with the intensivity of the AMe synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulopsis utilis*. Schlenk and associates were able to show that the AMe synthesis reached its maximum after 10 hours, and holds this level for the 40-hour duration of the experiments. The fact that after 20 hours'incubation I noted a considerable fall in the tocopherol total is probably the results of difficulty in preserving the sterility of the seedlings and the decomposition process occurring in this connection.

The concentrations of hydrogen ions on the total tocopherol did not appear to be critical. The optimum synthesis of α-tocopherol was achieved at pH 6,6. It is very likely that this pH is the optimum, either:

(1) for the enzyme responsible for the AMe synthesis, or

(2) for the transmethylase transferring —CH_3 from AMe to γ-tocopherol.

If such a hypothesis is accepted, the first case would not accord with the optimum indicated by Mudd and Cantoni for MAE from Fleischmann baker's yeast, which accepts a fairly wide range of pH values, around pH 7,6. The second alternative would be more likely, since Shapiro (1958) has shown that extracts obtained by the disintegration of cells of *Escherichia coli, Aerobacter aerogenes, Saccharomyces cerevisiae* and *Torulopsis utilis* with ultrasonic waves catalyzed the transfer of —CH_3 at pH 6,5—7,0.

The lack of essential changes in the α-tocopherol content at pH 7,8 is perhaps conditional on the increased activity of hydrolyzing enzymes of the pyrophosphate bounds of ATP (e.g. of nucleotide pyrophosphatase at optimum pH 6,5—8,5) occuring in plants (Lassota 1958). The deprived tissues would thus become a substrate for the AMe synthesis, and on the other hand the liberated pyrophosphate (PP) could act as inhibitor of MAE which was demonstrated in rat liver (Cantoni and Durell 1957) and later also in yeast (Mudd and Cantoni 1958).

We also known, from Mudd and Cantoni's work, that AMe is very unstable at pH around 8,0.

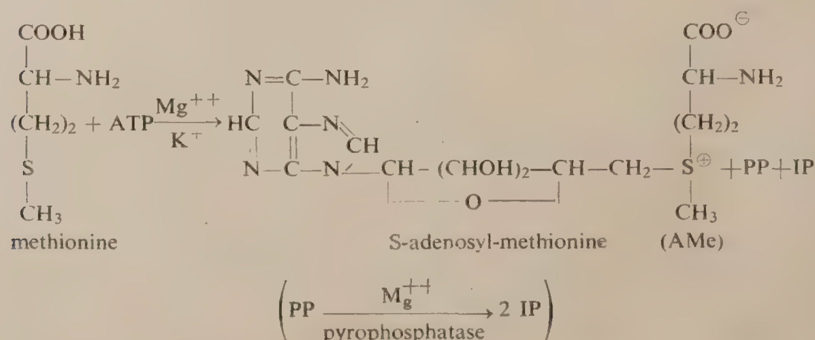
If the inhibiting action of PP also extends to MAE in plants, the somewhat adventageous effect of pH 5,6 on the synthesis of α-tocopherol could explain the often-noted decomposition of PP under the effect of plant tissues at this pH value (c. f. Lassota 1958).

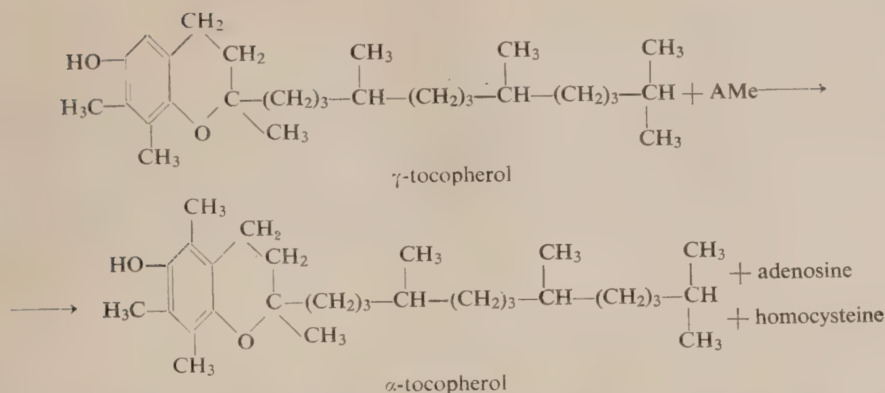
Pierpoint (1957a, 1957b) indicated such an action in extracts from pea seedlings at pH 5,0. The decomposition of PP, if it occurs in such conditions, would act against the inhibition of MAE and AMe would have better conditions for the synthesis.

The quicker synthesis of α-tocopherol in samples infiltrated with methionine and with methionine plus ATP is an argument in favour of the transmethylation hypothesis.

The concentrations of methionine used besides 0,02 M are relatively strong. It can be seen from my predecessors'work that only an inconsiderable part of the given methionine plays a part in the AMe synthesis. Schlenk and associates (1959), because of the ease with which *Saccharomyces* and *Torulopsis* synthesize AMe, obtained a yield of the order of 10—20%. According to these authors the presence of other amino acids has the effect of lowering this output. There is a relatively large number of free amino acids in pea seedlings and thus in this case the yield may be even more reduced (in Schlenk's case 30—60%). These authors, however did not observe the formation of S-adenosyl-methionine at any time; normally one stereoisomer formed, most frequently L. In my own experiments I used D,L-methionine and this fact was also not without effect on the yield of α-tocopherol.

The cooperation of ATP in reinforcing the synthesis of α-tocopherol is probably connected with the AMe synthesis. In the light of the results obtained, the following scheme of the methylation of γ-tocopherol might be accepted:





This scheme also includes the action of AMe, the presence of which in the pea was not observed until now.

However, Mudd (1960a, 1960b) has recently shown that extracts from barley and millet seedlings may contribute to the methylation of alkaloids; what is more, that in higher plants AMe is synthesized and fills the role of donor of the methyl groups. These two recent papers supply the basis for accepting the pathway indicated for the synthesis of α-tocopherol in the germinating pea. The results obtained are in agreement with the supposition, the final answer to how far my conclusions are correct can only be given by carrying out experiments using the labelled methionine-methyl C^{14}.

CONCLUSIONS

1. The occurrence of α, γ, and δ-tocopherols in the first days of germination of the pea (*Pisum sativum* L.) has been confirmed. δ-Tocopherol disappears when the seedlings has reached a length of about 3 cm.

2. An increase in the total of tocopherol in the first days of germination, and a decrease from the third day to the end of the 7-days experiments, were observed. This is conditional on the increase of intensivity in the synthesis of carotenoids.

3. An increase in α-tocopherol content with the growth of the plant and occurring with a simultaneous decrease in γ-tocopherol, was shown to exist.

4. Methionine and ATP reinforce the synthesis of α-tocopherol. The optimal concentration of methionine for this synthesis is 0.1 M and ATP is $1 \cdot 10^{-3}$ M.

5. It was determined that the optimum time of incubation for pea--seedlings infiltrated with methionine and ATP, in the synthesis of α-tocopherol, is 10 hours.

6. The most intensive synthesis of α-tocopherol under the influence of methionine was observed at pH 6,6.

7. A scheme of the synthesis of α-tocopherol in vivo in young pea--seedlings was formulated, leading to the methylation of γ-tocopherol. While not embarking on the problem of the synthesis of tocopherols in the whole life-cycle of plants, the author thinks that α-tocopherol arises principally in the transmethylation of non-α-tocopherols in the germination period of the pea.

Department of Plant Physiology
Maria Curie-Skłodowska University, Lublin
Director, Prof. Dr. A. Paszewski

(Entered: 23.I.1961)

STRESZCZENIE

Green w badaniach nad składem i lokalizacją tokoferoli w okresie wegetacji roślin sugerował możliwość demetylacji α-tokoferolu jako etapu w syntezie pozostałych tokoli, a także brał pod uwagę proces odwrotny (1958).

Niezależnie od Greena w swojej poprzedniej pracy autor wysunął przypuszczenie, że α-tokoferol może powstawać z jedno- i dwumetylotokoli na drodze ich metylacji (1959).

W niniejszej pracy postanowiono przebadać możliwość metylacji γ-tokoferolu do α-tokoferolu z wykorzystaniem metioniny jako donatora grup metylowych.

Badania nad biosyntezą α-tokoferolu przeprowadzono na 2-dniowych odciętych kiełkach grochu odmiana Victoria in vivo metodą infiltracji. Biosyntezę α-tokoferolu mierzono przyrostem tego związku na jednostkę suchej masy w zależności od czasu inkubacji, pH środowiska, stężenia infiltrowanej metioniny i ATP.

Przed przystąpieniem do badań nad mechanizmem syntezy α-tokoferolu ustalono, jakim fluktuacjom ulegają tokole w procesie kiłkowania grochu i jaki jest ich stosunek do syntezy karotenoidów.

Tokoferole oznaczano według metody Greena zaakceptowanej przez Angielski Komitet Metod Analitycznych (1959).

Karotenoidy oznaczano metodą Workera (1957).

WNIOSKI

1. Potwierdzono występowanie w pierwszych dniach kiełkowania α, γ, δ-tokoferoli. δ-Tokoferol zanika po osiągnięciu przez kiełki około 3 cm długości.

2. Stwierdzono wzrost sumy tokoferoli przez pierwsze dni kiełkowania, a od 3 dnia jej spadek przez cały okres 7-dniowych doświadczeń. Uwarunkowany jest on prawdopodobnie wzrostem intensywności syntezy karotenoidów.

3. Wykazano wzrost zawartości α-tokoferolu z wiekiem rośliny zachodzący z równoczesnym spadkiem γ-tokoferolu.

4. Metionina i ATP wzmagają syntezę α-tokoferolu. Optymalne ze stosowanych stężeń metioniny dla tej syntezy wynosi 0,1 M, a ATP $1 \cdot 10^{-3}$ M.

5. Ustalono, że optimum czasu inkubacji infiltrowanych metioniną i ATP kiełków grochu przy syntezie α-tokoferolu wynosi 10 godzin.

6. Najintensywniejszą syntezę α-tokoferolu pod wpływem metioniny stwierdzono przy pH 6,6.

7. Zaproponowano schemat syntezy α-tokoferolu in vivo w młodych kiełkach grochu, sprowadzający się do metylacji γ-tokoferolu. Nie wchodząc bliżej w zagadnienie syntezy α-tokoferolu w pełnym cyklu życiowym roślin, wydaje się, że w okresie kiełkowania grochu α-tokoferol powstaje głównie na tej drodze.

Katedra Fizjologii Roślin UMCS w Lublinie
Kierownik, Prof. Dr A. Paszewski

REFERENCES

Alexander G. J., Gold A. M., Schwenk E., 1958, Biogenesis of Yeast Sterols. III. The origin of carbon 28 of ergosterol, J. Biol. Chem. 232 (2): 599—609.

Alexander G. J., Schwenk E., 1958, Biogenesis of Yeast Sterols. IV. Transmethylation in ergosterol synthesis, J. biol. Chem., 232 (2): 611—616.

Analytical Methods Committee, 1959, Report prepared by the Vitamin-E-Panel. The Determination of Tocopherols in Oils, Foods and Feeding Stuffs, Analyst 84, 999: 356—372.

Baddiley J., Jamieson G. A., 1954, Synthesis of "Active Methionine", J. Chem. Soc. (Lond.): 4280—4284.

Barrenscheen H. K., Pany J., 1940/41, Synthetische Leistungen des Keimlings. III. Mitt. Die Methylierung von Guanidinessigsäure zu Kreatin durch etiolierte Weizenkeimlinge, 1 Teil. Biochem. Z., 310 (6): 344—349.

Baszyński T., 1959, Wpływ światła na syntezę tokoferoli u *Zea mays* L. w początkowym okresie wzrostu, Acta Soc. Bot. Pol. 28 (4): 621—633.

Beckmann R., 1955, Vitamin E. Ztschr. Vitamin-Hormon-Ferm. Forsch., 7 (4—5): 281—376.

Brown F., 1952, The Estimation of Vitamin E. 1. Separation of tocopherol mixtures occurring in natural products by paper chromatography, Biochem. J., 51 (2): 237—239.

Bukin W. N., Proniakowa H. W., 1959, Naturalne źródła witaminu B_{12} i ich wykorzystanie. III Międzynarodowe Sympozjum Witaminowe, Poznań, 189—191.

Cantoni G. L., 1956 in Liebecq C. Proceedings of the 3rd International Congress of Biochemistry, New York, 233.

Cantoni G. L., Durell J., 1957, Activation of methionine for transmethylation. II. The methionine activating enzyme: Studies on the mechanism of the reaction. J. biol. Chem., 225 (2): 1033—1048.

Chattopadhyay H., Banerjee S., 1952. Effect of germination on the total tocopherol content of pulses and cereals. Food Research 17 (4): 402—403.

Green J., 1958. The distribution of tocopherols during the life-cycle of some plants. J. Sci. Food Agric., 9 (12): 801—812.

Lassota Z., 1958. Fosfatazy roślin wyższych. Postępy Biochemii, IV (3): 347—354.

Mothes K., 1959. Über neue Arbeiten zur Biosynthese der Alkaloide. 1 Teil. Die Pharmazie 14 (3): 121—132.

Mudd S. H., Cantoni G. L., 1958. Activation of methionine for transmethylation. III. The methionine-activating enzyme of bakers yeast. J. biol. Chem., 231 (1): 481—492.

Mudd S. H., 1960a. S-adenosylmethionine requirement for plant transmethylations, Biochim. Biophys. Acta 37 (1): 164—165.

Mudd S. H., 1960b, S-adenosylmethionine formation by barley extracts, Biochim. Biophys. Acta 38 (2): 354—355.

Pawełkiewicz J., 1959, Mechanizm biosyntezy witaminu B_{12}, III Międzynarodowe Sympozjum Witaminowe, Poznań, 117—131.

Pierpoint W. S., 1957a, The Phosphaesterase of Pea Plants (*Pisum sativum* L.), Biochem. J. 67: 466—472.

Pierpoint W. S., 1957b, The Phosphatase and Meta-phosphatase Activities of Pea Extracts, Biochem. J. 65: 67—76.

Rege D. V., Srenivasan A., 1954, Conversion of uracil to thymine by strains of *Bacillus subtilis*, J. biol. Chem. 208: 471—476.

Schlenk F., Dainko J. L., Stanford S. M., 1959, Improved Procedure for the Isolation of S-Adenosylmethionine and S-Adenosylethionine, Arch. Biochem. Biophys. 83: 28—34.

Schröter H. B., 1955, Biologische Methylierungen, Die Pharmazie 10 (3): 141—157.

Schröter H. B., 1958, IV. Methylierungsvorgänge in Pflanzen. Ruhland W. Handbuch der Pflanzenphysiologie 8: 879—882.

Shapiro S. K., 1958, Adenosylmethionine-homocysteine transmethylase, Biochim. Biophys. Acta 29 (2): 405—409.

Worker N. A., 1957, A rapid procedure for the chromatographic separation and spectrophotometric estimation of certain pasture lipids. I. Carotene, Xanthophyll and Chlorophyll, J. Sci. Food Agric (8): 442—444.

Zacharowa M. P., 1954, K woprosu ob obrazowanii i lokalizacji witamina E u rastienii, Trudy WNIWI, V, 159—163.

ACTA SOCIETATIS
BOTANICORUM POLONIAE
Vol. XXX — Nr 2
1961

An improved microrespirometer and extension of its application over plants with big leaves

by

W. STARZECKI

INTRODUCTION

This paper presents the description of some improvements in the construction of the microrespirometer devised by J. Zurzycki (1955 a and b) and destined for researches on photosynthesis and respiration. Due to its great sensitivity permitting the evaluation of 10^{-3} microliters of gas, it could be applied for measurements of assimilation rates of small objects not exceeding several square milimeters area. Its construction enabled also a microscopic observation (magnification 100—150) of the assimilating object, during the whole time the measurements were performed. Changes of illumination intensity were achieved by shifting the lightening equipment on the optical bank.

With the aid of the microrespirometer of Zurzycki the following problems made the subject of a detailed study:

1. The influence on photosynthesis of the arrangement of chloroplasts in a cell (Zurzycki 1955a and b),
2. The influence of polarised light on photosynthesis (Zurzycki 1955c),
3. The action of inhibitors on the intensity of respiration and photosynthesis (Zurzycki 1955 d),
4. The harmful action of light of high intensity on leaves (Zurzycki 1957),
5. A research on the photosynthesis and respiratory activity (including the determination of the points of compensation and light saturation) of various forms of the fern *Asplenium trichomanes* grown in intensive and poor natural illumination (Starzecki 1958),
6. Dependence of photosynthesis on light intensity and thickness of the leaf of *Asplenium trichomanes* (Starzecki 1959),
7. Quantum yield of photosynthesis of leaves of *Asplenium trichomanes* (Starzecki, in preparation),

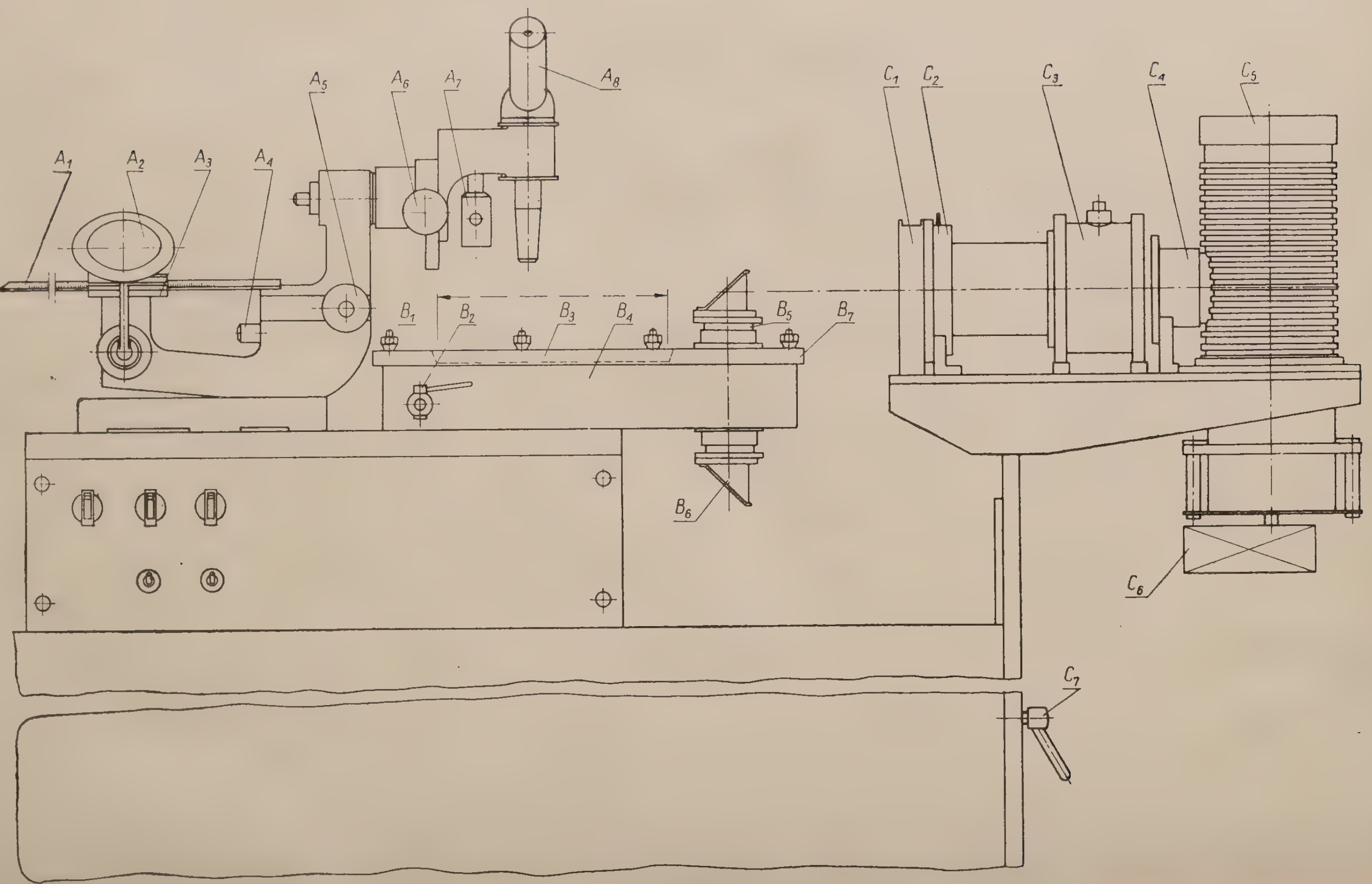


Fig. 1

8. Finally a detailled study on the influence of rhodamine B on photosynthesis was performed with the help of the modified microrespirometer (Zurzycki and Starzecki 1961).

Assimilating organs of following plant species provided the material used in the above mentioned studies: *Mougeotia* (fragments of filament), *Spirogyra* (fragments of filament), *Lemna trisulca* (individual fronds), *Asplenium trichomanes* (individual leaflets).

This paper consists of two parts: the first is a description of an improved microrespirometer in the line of attaining a greater number of repetitions in the same period of time, an easier handling, a better utilization of the light energy emited by the light source and a possibly wide range of regulating the light intensity and temperature. In the second part the possibilities cf applying the improved microrespirometer for the determination of photosynthesis of large leaves are examined.

CHANGES IN THE CONSTRUCTION OF THE MICRORESPIROMETER

a. No changes in the working principle of the apparatus of Zurzycki (1955a and b) have been introduced into the new design of construction (fig. 1). Its principle is based on measurement of the change of volume caused by uptake or emission of oxygen. The application of bicarbonate buffer of Warburg assures a constant concentration of CO_2 in the atmosphere of the chamber.

Changes of volume are read from the position of a karosene drop in the capillary.

The respirometer constructed by Zurzycki in 1955 was equiped with two micro-chambers: the reaction chamber and thermobarometric chamber were of the same size and shape. The new modification contains

Fig. 1. Microrespirometer (whole set)

Indications: A — refer to the microscope with a horizontal movement; B — to the main chamber; C — to the lightening equipment

A_1 — a rod with a milimeter scale; A_2 — magnifying glass for reading the scale; A_3 — handle with the nonius; A_4 — screw blocking the sliding movement; A_5 — screw for the horizontal mouvement; A_6 — screw for focusing adjustment; A_7 — lamp for illumination the scale; A_8 — microscope; B_1 — screws to fasten the cover; B_2 — stopcock to equalize the pressure; B_3 — window through which the kerosene meniscus is read; B_4 — base of the chamber; B_5 — prism with holder for illuminating the object from the upper side; B_6 — prism with holder for illuminating the object from the lower side; B_7 — cover of the chamber; C_1 — frame (handle) for filters; C_2 — holder of the lens and the iris diaphragm; C_3 — holder for liquid filter; C_4 — holder of the lens; C_5 — holder of the lamps; C_6 — motor of the exhaustor; C_7 — screw blocking the horizontal movement of the lightening equipment.

4 micro-chambers bored in a brass plate 45 × 32 × 3 mm in size (fig. 2). The circular chambers Ø 7 mm are closed on their lower side with a glass plate ±0,7 mm thick which is stuck tightly with araldite. On the upper side of the plate, elliptical hollowings 0,6 mm deep enclose the reaction chambers connected with the ends of respective capillaries. For experiments the micro-chambers are prepared in the following manner: kerosene columns 10 mm long are introduced into the capillaries by means of a pipette. They are deplaced through the whole length of the capillaries

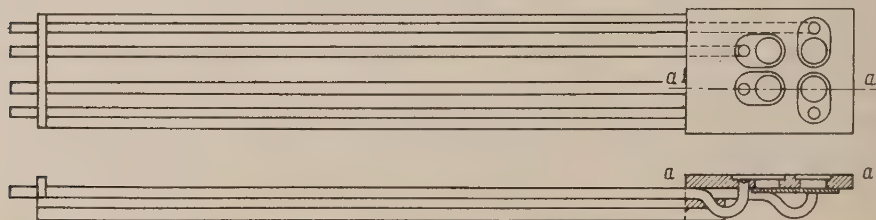
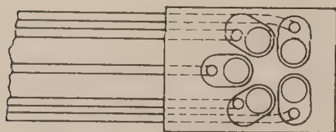


Fig. 2. Plate with four micro-chambers: at the top — view from above, at the bottom — view from one side and in the section through the axis a—a

in order to moisten the inner walls. After this had been accomplished the kerosene columns are placed near the middle of the capillary length. Then 35 μl Warburg's carbonate buffer No. 10 are pipetted into every chamber. The chambers are closed on their upper side with a cover glass fitted to the elliptical shape of the brim round the chambers. The experimental material is placed in hanging drops on three elliptical cover glasses. The fourth chamber with no material is also covered with a glass plate and acts as a thermobarometer. The fissures between the glass and the edges of the elliptical brim of the plate are filled with melted vaseline, in order to make them tight, but a small part of these fissures


Fig. 3. Plate with five micro-chambers

remains unfilled. The micro-chambers are finally closed when their temperature is equalized with that of the macro-chambers. Micro-chambers with five capillaries (4 reaction chambers and one thermobarometer chamber) may also be used in the apparatus. Fig. 3 shows the distribution of the 5 micro-chambers on the brass plate.

b. Macro-chamber. The macro-chamber (fig. 1 B) serves to place the micro-chambers in, to maintain a constant temperature during the whole

experiment and acts also as compensation chamber. In the previous construction this chamber constituted formally a separate unit.

Micro-chambers are placed in the elongated cavity of the water bath with water circulation, supplied by a Hoepler's ultrathermostat. There is a small window under the brass plate with the micro-chambers through

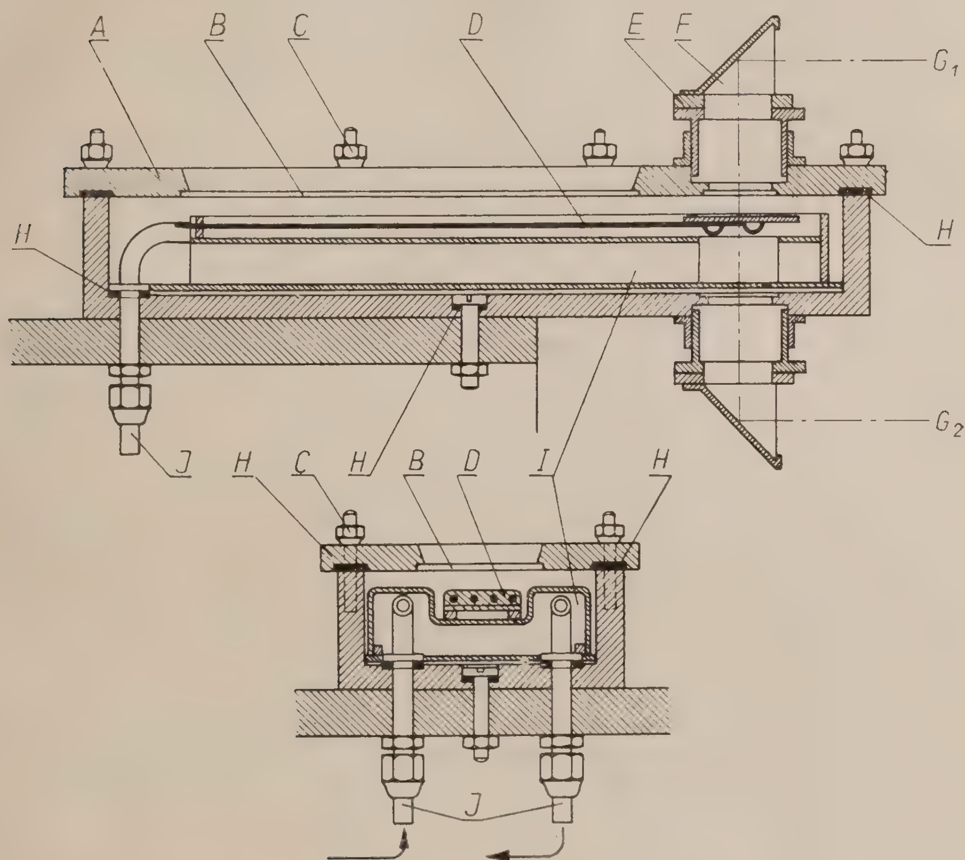


Fig. 4. Main chamber (sections):

A — cover of the chamber; *B* — window through which the kerosene meniscus is read; *C* — screws to fasten the cover; *D* — plate with micro-chambers; *E* — prism holder; *F* — prism; *G* — boundle-light; *H* — liners; *I* — water bath; *J* — connector for the ultrathermostate

which light can penetrate. There is a similar window in the cover too. Both these windows are hermetically closed with glass plates. Glass prisms attached to a piece movable in vertical direction are placed on the outer side of the windows. These prisms change the horizontal direction of the

light beams to a vertical and perpendicular to the surface of the plate of the micro-chambers (fig. 4). Having removed the upper prism with the movable cylindrical piece it is possible to set up a microscope deprived of its table and provided with a COOK's A.E.L. × 20 or × 40 objective.

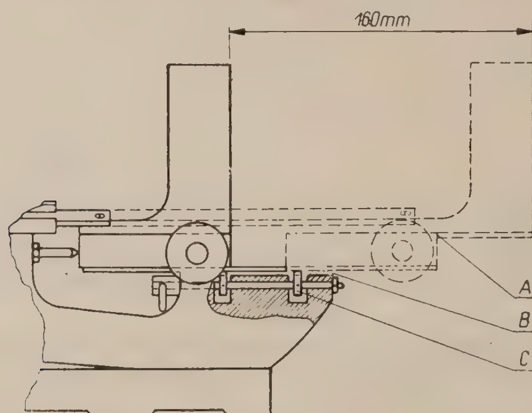


Fig. 5. Scheme presenting the principle of the horizontal movement of the microscope: *A* — microscopic mouvement macro; *B* — sliding mouvement; *C* — arrangement blocking the sliding movement

In this way a direct observation of the object during the experiment is achieved. The cover is screwed hermetically on a ruber liner with 8 screws. The ruber liner is fixed in the brim of the cover. The equalization of inner pressure and outer atmospheric pressure is achieved by means

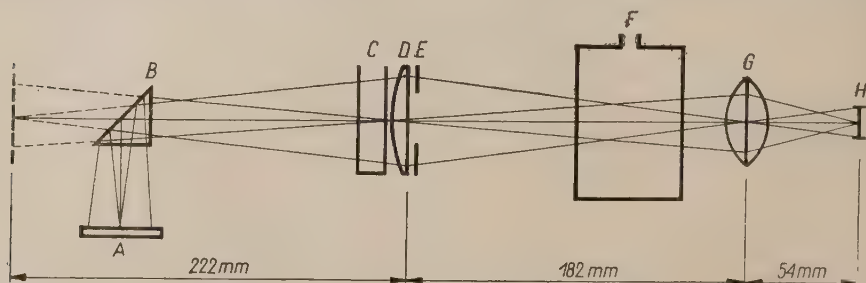


Fig. 6. Scheme of the lightening equipment: *A* — plate with micro-chambers; *B* — prism; *C* — holder of the glass and interference filters; *D* — lens; *E* — iris diaphragm; *F* — glass cell for liquid filter for absorption of heat radiations; *G* — lenses; *H* — filament of the bulb

of a stop-cock fastened to the sidewall of the macro-chamber. There is still in the cover a small window 165 × 35 mm. It is hermetically closed with a glass plate 3 mm thick. This window enables the reading of the position of kerosene meniscus in the capillaries.

c. Microscope with a horizontal movement. This microscope is used for readings of the position of the meniscus of kerosene drops in the capillaries (fig. 1A). A range of movement restricted to 80 mm was a great inconvenience of the formerly used microscope, as the length of the capillaries was 160 mm. An increase of the range of reading was achieved by moving the microscope along the capillar axis. This structural inconvenience has been improved by introducing an additional sliding arrangement which extended the range of readings to the whole length of

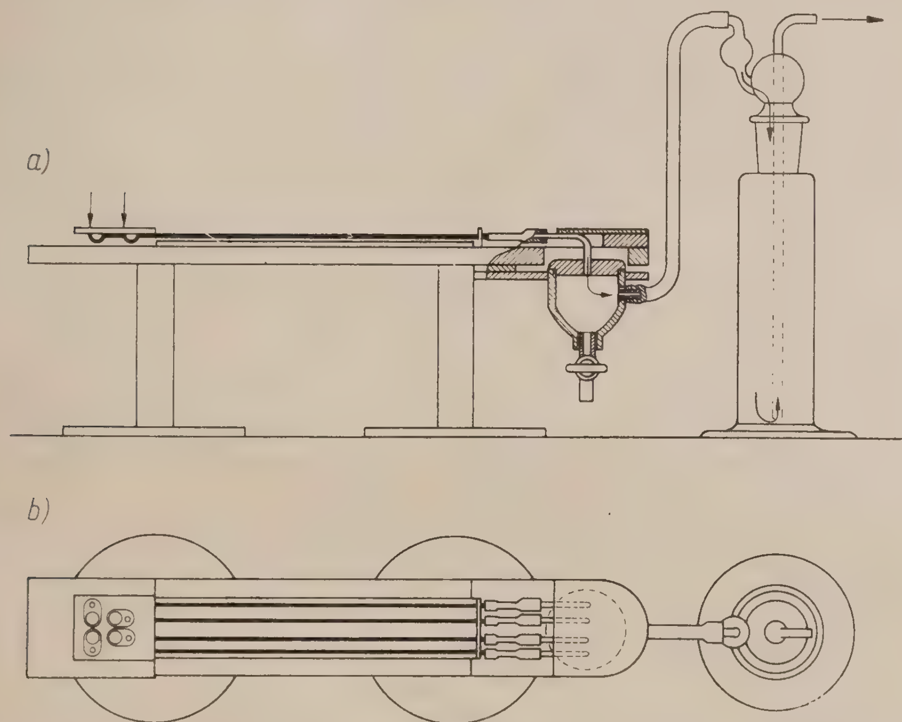


Fig. 7. Arrangement for washing the capillaries. At the top — view from one side, arrows show the air circulation (*a*), at the bottom — view from above (*b*)

the capillaries. The working scheme of this arrangement is shown in fig. 5.

The procedure adopted for reading the position of the index in the capillary has been also modified. In the former type the microscopic ocular was provided with a scale consisting of 50 divisions. The optical equipment of the microscope was chosen in such a way that the 50 divisions in the ocular corresponded exactly to 5 mm. an interval corresponding to 5 mm of the scale of the capillaries. To perform the readings, the scale of the ocular had to be adjusted for the place where the meni-

scus of kerosene was. It was possible then to read the position of the kerosene index, with accuracy to 0,1 mm.

In the new modification the ocular scale has been replaced by a line perpendicular to the scale of the capillaries. A rod with a milimeter scale is fastened to the microscope and moves in the handle fixed to the microscopic table when the microscope moves horizontally. A nonius is attached to the handle by means of which any change of the position of the microscope can be read with accuracy to 0,1 mm. A 3 times magnifying glass is placed above the nonius in order to make the readings easier.

d. The lightening equipment consists of a projection lamp 250 W 220 V and two lenses (25 and 12 dioptres) which are placed as shown in the scheme (fig. 6). This equipment gives an uniformly illuminated light spot of 34 mm diameter on the windows of the micro-chambers. The light intensity is regulated by diminishing or enlarging the diameter of the iris diaphragm placed behind the second lens. The light intensity may also be modified to a certain extent by changing the voltage by means of an autotransformator. The lightening equipment is fixed to rails which enable the vertical movement of the equipment and the illumination of the object from its upper and lower side.

e. A special equipment for washing the capillaries has been established (fig. 7). Cleaning fluid, distilled water and ethanol are introduced in turn into the capillaries by means of a water pump. The washed capillaries are then dried with a current of air.

For other details concerning the preparation of the apparatus for experiments and their execution the reader is referred to Zurzycki (1955a and b).

EMPLOYING OF THE MICRORESPIROMETER FOR PLANTS WITH LARGE LEAVES

As it was already said the microrespirometer was destined for examinations performed on small objects not exceeding 5 mm in length. To employ this microrespirometer for greater organs, for instance leaves, fragments of these organs must be used. This part of work aimes to examine whether a disk cut out of a leaf blade can provide convenient experimental material. In this connection the question arose whether the rates of respiration and photosynthesis undergo any changes in the course of experiment and whether there is a period of time with no fluctuations of greater importance.

It should be stressed however, that the rates of assimilation and respiration obtained on a leaf fragment do not represent the analogous

rates of the function of a whole leaf organ not separated from the mother plant. If, however, a leaf fragment proved to keep in constant conditions, for a time on the same level, without showing any visible changes, it could be used as experimental material for certain investigations.

a. Material and methods

Discs 4 mm in diameter cut out of leaves of *Pelargonium* and *Tropaeolum* provided the material used in this study. Only leaves of fully grown plants were used. Measurements started 1 hour after the discs were cut. The period of performing measurements was gradually extended from 2,5 hours to 72 hours. In the two first experiments the discs remained in the microrespirometer during the whole experiment. In other experiments the discs were kept in a weighing bottle between two successive measurements.

Cotton wool saturated with tap water was placed at the bottom of the bottle and covered with filter paper. Discs were cut out with cork-borer and placed on this paper (fig. 8). In this way the discs were completely protected from drying. The investigated material (experiment 3) remained

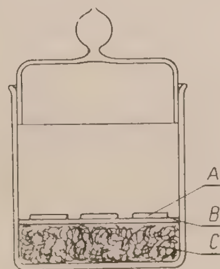


Fig. 8. The way of keeping the discs of leaf blades in a vessel: *A* — discs of a leaf blade; *B* — filtration paper; *C* — cotton wool

in a dark or light thermostat in about 21°C. The light thermostat was illuminated with fluorescent tubes which gave 1.100—1.200 lux light intensity on the surface of the bottle. In the last experiment (Nr. 4) the weighing bottles were kept in a room from which immediate sun radiation was excluded. Figures given in tables are the result of interpolation of 6 measurements performed in 5 minutes long intervals.

b. The experimental results

Experiment 1. The first experiment was performed in order to examine the respiration intensity of a disc cut out of a leaf blade immediately after cutting and 2,5 hours later. It is impossible to perform

Table 1

Respiration intensivity of discs cut from *Tropaeolum* leaves

Disc No.	*A*	*B*	$100\% - \left(\frac{B}{A} \cdot 100\right)\%$
1	102	47	54
2	51	35	32
3	55	43	22
4	63	35	45
5	63	39	38
6	39	31	21
7	39	39	0
8	43	43	0
9	55	35	36
10	66	39	41

(x^{10-2} μl/5 min/disc), *A* — 1 hour, *B* — 2,5 hours after cutting the discs

experiments immediately after cutting because it takes 40—60 minutes to prepare the microrespirometer for measurements. So the first measurement was made 1 hour after the disc was cut. Subsequently 6 measurements were performed within 30 minutes in 5 minutes intervals. The measurement was repeated 2,5 hours after cutting. Results are shown in table 1 and 2. In almost all cases the respiration intensity was higher when measured after 1 hour than that measured after 2,5 hours. No differences were observed only exceptionally. Respiration intensity A was never observed to be lower than result B obtained after 2,5 hours. On the average, for *Pelargonium* respiration A is 16,9% and for *Tropaeolum* 28,9% more intensive.

Table 2

Respiration intensivity of discs cut from *Pelargonium* leaves

Disc No.	*A*	*B*	$100\% - \left(\frac{B}{A} \cdot 100\right)\%$
1	59	59	0
2	86	70	13
3	71	51	28
4	63	51	19
5	67	55	18
6	63	55	13
7	78	55	3
8	55	55	0
9	84	62	26
10	55	43	2

(x^{10-2} μl/5 min/disc), *A* — 1 hour, *B* — 2,5 hours after cutting the discs

Experiment 2. It has been observed in the previous experiment that the respiration rate decreases gradually with the course of time. The purpose of this experiment was to analyse these changes in details. Observations were made on *Tropaeolum*. The first measurement was performed 1 hour after cutting the disc. The oxygen uptake (fig. 9) was measured in 5 minutes long intervals.

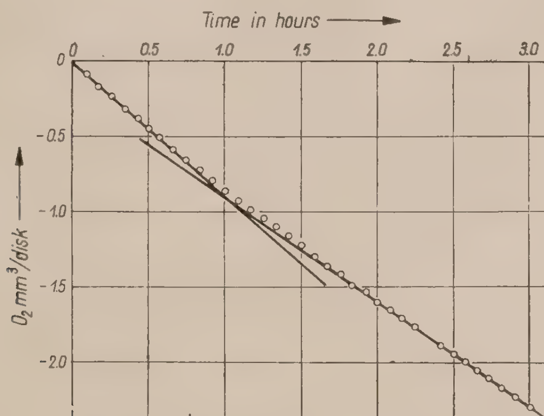


Fig. 9. Changes in the respiration of the disc cut from a leaf blade, first measurement performed 1 hour following cutting

Respiration intensity attains the highest value for the first half an hour following the start of measurement and then begins to decrease gradually. After 1,5 hour it becomes stabile at a lower level. Considering the period of 1 hour preceding the first measurement the respiration intensity of the disc in this case became stable after 2,5 hours. In other cases the period of time necessary for the stabilization of respiration intensity fluctuated between 1,5 to 2,5 hours. Altough in no case the period of stabilization exceeded 2,5 hours, it is safer however, to assume at least a 3 hours long period of time as necessary for respiration intensity of the disc to become stable.

Experiment 3. In this experiment the measurements were performed for 10 hours following cutting.

The material remained in a weighing bottle between two succesive measurements as it was described in the method. Since however, an isolated disc has no possibility of translocation of assimilates, there arose the question of examining whether the storage of assimilates in light conditions or decrease of the sugar level in darkness influences the course of metabolic processes occuring in the disc.

This experiment was performed in two different ways and was carried on for 10 hours and 30 minutes. Four measurements of respiration inten-

sities A, B, C, D were performed at the following hours after cutting: A — 1 — 1,30, B — 4 — 4,30, C — 7 — 7,30, D — 10 — 10,30. In the first case the discs remained all the time in darkness except for 5 — 10 minutes necessary for placing them in the microrespirometer. In the second case the discs remained during the time of measurements in darkness for 40 minutes. Data shown in the tables (3 and 4) corroborate in both cases

Table 3

Respiration intensivity of discs cut from *Tropaeolum* leaves

Disc No.	*A*	*B*	*C*	*D*
1	82	47	47	47
2	51	36	35	—
3	68	39	39	35
4	63	37	35	36
5	55	43	51	47

(x^{10-2} µl/5 min/disc), *A* — 1 hour, *B* — 4 hours, *C* — 7 hours, *D* — 10 hours after cutting the discs

Table 4

Respiration intensivity of discs cut from *Pelargonium* leaves

Disc No.	*A*	*B*	*C*	*D*
1	47	47	47	47
2	55	35	43	39
3	66	43	47	47
4	63	35	39	35
5	51	43	43	47

(x^{10-2} µl/5 min/disc), *A* — 1 hour, *B* — 4 hours, *C* — 7 hours, *D* — 10 hours after cutting the discs

the results obtained in previous experiments. The highest rate of respiration appeared in measurement A (1 hour after cutting). No essencial differences were observed in the successive measurements (B, C, D). It results out of these experiments that the fact of keeping the material in darkness or in faint light has no influence on the intensity of respiration. These results permit to assume that experiments on discs cut from leaves may be performed within 7 hours following the metabolical stabilization of the material.

Experiment 4. The purpose of this experiment was to observe whether there is any possibility of a still further prolongation of the

experiment. The material was observed for three days (72 hours) following cutting. In this experiment the rates of respiration and photosynthesis were measured once a day (24 hours). For measurements of photosynthesis light intensity of 3000 lux was applied. *Pelargonium* leaves provided the experimental material. This experiment was performed according to the following scheme: discs were placed immediately after cutting in weighing bottles kept not in the thermostat but in a room. After 24, 48, 72 hours the intensities of respiration and photosynthesis were measured. After measurements had been performed the discs were placed back into the weighing bottles.

Table 5

Intensivity of respiration and real photosynthesis of discs cut from *Pelargonium* leaves

Disc No.	*A*		*B*		*C*	
	respiration	photosynthesis	respiration	photosynthesis	respiration	photosynthesis
1	47	124	47	124	54	132
2	30	109	30	109	30	113
3	38	149	34	133	38	145
4	46	132	74	165	55	150

(x^{10-2} µl/5 min disc), *A*—24 hours, *B*—48 hours, *C*—72 hours after cutting the discs

Data obtained in this experiment are shown in tab. 5. It results out of this table that during this time there are no essential differences either in the results of respiration or in photosynthesis.

DISCUSSION

The experimental part of this work consists in utilization of discs of leaf blades for observations in the microrespirometer. It is well known that a mechanical injury of a leaf tissue causes disturbances in the plant. Niklewski (1933) established that respiration intensity of an injured tissue can increase by 50%. In more recent work Said and Shishiny (1944) examined the respiration on fragments of roots of *Raphanus sativus Aegyptiacus*. The fragments were 0,3, 1,0, 2,0 4,0 mm thick. The respiration intensity decreased with the increase of thickness and in distilled water the corresponding values were: 0,40, 0,32, 0,27, 0,18 g of CO_2 for 100 g fresh weight. For three days the respiration intensity only slightly decreased. The authors did not examine the influence of a comparatively more serious injury of the tissue in thinner fragments but they maintain

that a more intensive respiration depends on a better access of oxygen to the tissue.

Similar investigations were made by Allen and Price (1950) on a myxomycete *Physarum polycepharum*. They used fragments of plasmodium of various weights. The highest respiration intensity was observed with fragments of 100 mg weight. A less intensive respiration was observed with fragments which weight was above or below this level. The authors explain that the cause of the observed decrease of respiration intensity is different in both these cases. Respiration in plasmodia below 100 mg weight is less intensive because the injury is relatively great in comparison to the whole fresh weight of the plasmodium, whereas, the decrease of the intensity of CO_2 evolution is caused, according to the authors, by a more difficult access of oxygen, similarly as it was already suggested by Said and Shishina in their work.

Dr. Dwuraźna enabled me to make use of the results of unpublished observations. She experimented on 1,9 4,3 6,4 mm in diameter fragments of leaves of *Nicotina Tabacum* variety White Burley. She employed the Warburg apparatus for measurements of respiration, and established that 50—60 minutes following cutting the discs the respiration intensity remained on a constant level, but that the respiration of discs 1,9 mm in diameter was most intensive (6,85 μl CO_2 for 1 mg dry weight) and in other discs, 4,3 and 6,4 mm in diameter, respiration was lower and lower and attained successively 5,99 and 4,88 μl CO_2 for 1 mg dry weight. She observed, moreover, that after 60 minutes the respiration intensity gradually decreased. Basing the opinion on these data it is difficult to establish whether a more intensive respiration of smaller discs was caused by a greater injury or by a better access of oxygen. A decrease of respiration intensity after 60 minutes corroborates the observed changes in experiments performed in this work.

E. C. Wassink (1946) performed measurements of photosynthesis by means of the Warburg apparatus on discs 5 mm in diameter, cut out of a series of leaves of land plants. Measurement were performed in Warburg's carbonate buffer Nr. 9 or in water enriched by CO_2. Wassink thinks that his method of preparing the samples enables a considerable reduction of the dispersion and is suitable for establishing true photosynthesis of leaves of land plants. The author is not interested, however, either in the metabolical injuring of the leaf or in the influence of the wound on the metabolic processes.

In this work the respiration intensity was the criterion of possible disturbances. In the three first experiments the measurement of photosynthesis was practically impossible because it took place in time when greatest changes in respiration occured (1,5 hour after cutting the discs

from the leaf blade). In the second experiment measurements of respiration intensity could be performed every 50 minutes in turn with measurements of photosynthesis. In this case, however, it was not possible to follow the changes so detailful as it was with measurements only of respiration intensity. It was possible to observe changes of apparent photosynthesis but concomitant changes in respiration could lead to completely false conclusions. In the third experiment photosynthesis was not measured to avoid an additional illumination of the disc. It was only in experiment 4 when measurements were repeated every 24 hours that respiration and photosynthesis could be measured on one and the same disc without running any risk.

In these experiments it was examined whether the increase of respiration intensity caused by injuring is durable or if not — what its behavior is. The obtained results indicate that the respiration intensity stabilizes after 3 hours following cutting the discs and remains on this level for 72 hours. To examine respiration and photosynthesis on fragments of leaves we dispose of a material of stabilized physiological properties for a long period of time. The here applied method may also be employed for investigations on the influence of various factors on photosynthesis and respiration (light, temperature, stimulants, inhibitors and other substances). It may also be used for local measurements of photosynthesis on individual parts of a leaf. It may also be very helpful when comparing necrotic and healthy parts of a leaf. It also seems possible to apply it in order to compare the activity of photosynthesis and respiration in various varieties in genetical, selectional and culturing works especially when relative data are sufficient for this purpose. As there are no comfortable field methods the microrespirometer was also used to determine respiration intensity, compensation point and saturation point of photosynthesis of plants with small leaves (S t a r z e c k i 1958) collected on various habitats. It is, however, still a problem to settle to what an extent discs of leaves may be used for this kind of experiment. The results of this work have not determined to what an extent the results obtained from leaf discs may represent values of respiration and photosynthesis of the whole organ. It may be supposed that differences in the leaf blade itself (different thickness of the leaf blade, concentration and thickness of veins, differences in the content of chlorophyll, differences in structure etc.) will influence the results obtained with individual discs. On the other hand as the individual respiration intensity of the whole organ is not known, one can not say whether the stabilized respiration intensity after 3 hours following cutting of the discs drops to its initial level or if it is higher or lower in

comparison with it. We do not possess, however, a method which would permit to perform measurements of respiration intensity and photosynthesis of leaves of average size. This would make possible a direct comparison of results obtained from a whole organ and from discs cut from it (this remains a subject for a separate work).

The above given examples and the various papers mentioned in the introduction give evidence of a large range of possibilities of using the above described microrespirometer for investigations on photosynthesis and respiration.

SUMMARY

1. This paper presents a detailed description of an improved microrespirometer destined for researches on photosynthesis and respiration.

2. The modifications were introduced to enlarge the number of replications in the same period of time (from one to three or four). Besides the newly introduced modifications aimed at making the reading and the handling of the microrespirometer easier and at a better utilization of the intensity of the light source and regulation of temperature.

3. Keeping the discs in weighing bottles on a moistened paper in faint light or in darkness permits the conservation of material for three days in an unchanged and fresh state.

4. Discs cut out of a leaf blade may be used for observations after three hours following cutting the discs.

5. The apparatus can be applied when studying the following problems of respiration and photosynthesis:

a) the influence of external factors (light, temperature, inhibitors, stimulants and other substances),

b) local measurements within the leaf blade,

c) comparative measurements in genetical, selectional and breeding investigations,

d) in ecological investigations for measurement of respiration, compensation point and saturation value of photosynthesis.

I am indebted to the chief of the Institute prof. dr. F. Górski for his valuable advice and critics. I am also indebted to doc. dr. J. Zurzycki for his personal assistance in elaboration of the new technical solution of the microrespirometer.

Laboratory of Plant Physiology
Polish Academy of Sciences
Cracow

(Entered: 10.1.1961)

REFERENCES

Allen P. J. and Price W. H., 1950, The relation between respiration and protoplasmic flow in the slime mold *Physarum polycephalum*, Am. J. Bot. 37: 393—402.

Niklewski B., 1933, Fizjologia Roślin, Księgarnia Św. Wojciecha, Poznań.

Saïd H. and Shiskiny E. D. H., 1944, The effect of disc thickness on the respiration and the various nitrogen factors of cut discs of radish roots immersed in water and in sugar solutions. Plant Physiol. 19: 660—670.

Starzecki W., 1958, Wpływ mikroklimatu jaskiń na zmiany morfologiczne, anatomiczne i fizjologiczne u *Asplenium trichomanes* L. i *A. ruta-muraria* L., Acta Soc. Bot. Pol. 28: 221—248.

Starzecki W., 1959, Dependence of photosynthesis on light intensity and thickness of the leaf of *Asplenium trichomanes*, Acta Biol. Cracov. Series Bot. 2: 35—42.

Wassink E. C., 1946, Experiments on photosynthesis of horticultural plants, with the aid of Warburg method, Enzymol. 12: 33—55.

Zurzycki J., 1955a, The dependence of photosynthesis on the arrangement of chloroplasts, Exper. 11: 263—264.

Zurzycki J., 1955b, Chloroplast arrangement as a factor in photosynthesis, Acta Soc. Bot. Pol. 24: 27—63.

Zurzycki J., 1955c, Photosynthesis in polarized light, Acta Soc. Bot. Pol. 24: 539—547.

Zurzycki J., 1955 d, Influence of same catalyst poisons on the phototactic movements of chloroplasts, Acta Soc. Bot. Pol. 24: 663—674.

Zurzycki J., 1957, The destructive effect of intense light on the photosynthesis apparatus, Acta Soc. Bot. Pol. 26: 157—175.

Zurzycki J. and Starzecki W., 1961, Photosynthesis of *Elodea canadensis* after vital staining with Rhodamine B, Protoplasma 53: 57—75.

ACTA SOCIETATIS
BOTANICORUM POLONIAE
Vol. XXX — Nr 2
1961

Elajoplasty ślazowatych

Élaïoplastes chez les Malvacées

A. WAŁEK-CZERNECKA i M. KWIATKOWSKA

WSTĘP

Elajoplasty są dotąd mało poznane. Niewiele wiemy o ich występowaniu w świecie roślinnym, sprzeczne są poglądy na pochodzenie elajoplastów oraz ich rolę w roślinie. Tym samym terminem oznacza się składniki komórki o różnym znaczeniu morfologicznym i fizjologicznym.

U wyższych roślin opisano elajoplasty u blisko 100 gatunków, z których większość należy do roślin jednoliściennych. Wśród roślin dwuliściennych stwierdzono elajoplasty u *Malvaceae* (Politis 1911. Luxenburgowa 1927, 1928), u *Compositae* u *Gaillardia* (Beer 1907), ostatnio u *Dahlia variabilis* (Kwiatkowska, praca nie opublikowana), u *Cucurbitaceae* (Riss 1918), u 16 gatunków *Gentianaceae* (Kwiatkowska 1959).

Co się tyczy rodziny *Malvaceae*, Politis podaje, że elajoplasty występują u 6 gatunków *Hibiscus*, u *Althaea rosea*, *Malva rotundifolia*. *M. silvestris* i *Gossypium arboreum*. W pracy Politisa nie ma bliższych opisów elajoplastów, autor zaznacza jedynie, że w stadium dojrzałym mają postać kul zebranych w grono; nie zajmuje się ani rozmieszczeniem elajoplastów w obrębie rośliny, ani ich rozwojem.

W pyłku 2 przedstawicieli ślazowatych, a mianowicie u *Malope trifida* i *Malva silvestris* obserwowano również skupienia „ciałek tłuszczowych" podobne do elajoplastów (Luxenburgowa, 1927, 1928). Z uwagi na obecność podłoża plazmatycznego uznano je za homologi plastydów.

MATERIAŁ I METODY

Rośliny pochodziły z kilku ogrodów łódzkich. Wczesne stadia rozwojowe otrzymano z nasion wysiewanych na wilgotnej bibule w szalkach Petriego, hodowanych następnie w wodzie, w komorze wilgotnej. Część młodych roślin przeniesiono dla dalszych obserwacji do gruntu.

Głównym obiektem badań była *Althaea rosea* L. Cav. Młode stadia rozwojowe i rozpadanie się elajoplastów obserwowano również u *Malva neglecta* Wallr. Badano przeważnie skórkę; w korzeniach wzięto pod uwagę i inne tkanki.

U *Malope trifida* Cav., *Althaea officinalis* L., *Malva mauritiana* L., *M. silvestris* L., *M. pusilla* Sm., *Lavatera thuringiaca* L. i *Sidalcea candida* A. Gr. ograniczono się do stwierdzenia obecności i charakteru elajoplastów bądź w hypokotylu i organach kwiatowych, bądź tylko w tych ostatnich.

Badania elajoplastów u ślazowatych nastręczają duże trudności natury technicznej. Elajoplasty są nietrwałe, zmieniają się we wszystkich środowiskach, w których są oglądane. Dezorganizacja występuje już w żywych komórkach. Stąd w badaniach przyżyciowych, które stanowią podstawę niniejszej pracy, wypadało położyć specjalny nacisk na szybkość obserwacji i na ich wielokrotność. Po wypróbowaniu różnych środowisk zatrzymano się na wodzie wodociągowej, niekiedy oglądano preparaty w oleju parafinowym i w rozcieńczonych roztworach barwników przyżyciowych.

Spośród zwykłych metod cytologicznych utrwalania materiału dobre wyniki dało tylko utrwalanie czterotlenkiem osmu, który stosowano bądź jako pary (od 2—3 do 10 min), bądź w roztworach 1 i 2%. Płyny Bouina, Nawaszina, Lewickiego i Regaud zniekształcały elajoplasty, rozpuszczając w różnym stopniu tłuszcze (tab. III, fig. 10). Po zastosowaniu metody Mevesa i McManusa oraz utrwalacza formalinowo-wapniowego Bakera zachowały się wprawdzie lipidy, ale postać elajoplastów była również zmieniona (tab. I, fig. 16).

Utrwalone preparaty barwiono hematoksyliną żelazową Heidenhaina, kwaśną fuksyną wg Altmanna, Sudanem czarnym B z podbarwieniem skrawków czerwienią obojętną (Pearse 1957).

Utrwalano wprost skórkę ściętą z powierzchni organów; z hypokotyla i wierzchołka korzenia *A. rosea* przygotowano również skrawki parafinowe.

Posługiwano się także preparatami gniecionymi. Rozgniatano wierzchołki młodych korzeni (1—3 mm długości) w wodzie, po czym utrwalano je w parach czterotlenku osmu. Kiedy indziej utrwalano szczyty korzonków w całości i po przemyciu 1 2 godz wodą przenoszono do HCl 1n na 5 min, co ułatwiało izolowanie komórek w tkankach rozgniatanych następnie w kropli gliceryny.

Próbowano barwić elajoplasty barwnikami zasadowymi metodą Pernera (1953). Ksylen nie usuwał jednak zaczerwień z elajoplastów nawet po kilkunastu dniach. Natomiast pewne zastosowanie znalazła ta metoda przy barwieniu ziarnistych utworów powstałych z rozpadu elajoplastów.

Pewne modyfikacje metody Pernera wprowadzone w pracy będą omówione później.

Celem ustalenia charakteru lipidów występujących w elajoplastach zastosowano szereg barwników i reakcji cytochemicznych. W większości przypadków kierowano się wskazówkami podanymi przez Pearse'a (1957). Inne źródła są zaznaczone w tekście. Lipidy obojętne barwiono roztworem Sudanów III i IV w alk. 70% lub w płynie Hexheimera (wg Kay i Whiteheada) oraz czerwienią oleistą w izopropanolu (wg Lilliego 1944). Barwiono materiał świeży i utrwalony. Dla odróżnienia lipidów obojętnych od kwaśnych stosowano wodny roztwór błękitu Nilu 1% (Cain 1950), po utrwalaczu formalinowo-wapniowym i na materiale świeżym. Fosfatydy wykrywano metodą Feyrtera i testem kwaśnej hemateiny Bakera z kontrolą ekstrakcji pirydyną. Na lipidy nienasycone wskazywało natychmiastowe wyczernianie elajoplastów przez roztwory zawierające OsO_4; na fosfolipidy nienasycone — reakcja PFSA przy zastosowaniu kontroli Lilliego blokowania bromem. Jako reakcją na kwasy tłuszczowe posługiwano się reakcją Fischlera oraz reakcją Barrolliera i Suchowsky'ego (1959). Wykonano reakcję plazmalową na lipidy acetalowe (wg Hayesa 1949) na materiale utrwalonym w formalinie zbuforowanej.

Próbowano wykryć cholesterol i jego estry reakcją Schultza (wg Romieu) w materiale świeżym i utrwalonym w formalinie zbuforowanej fosforanami wg Lilliego (1948), ergasterol reakcją z kwasem trójchlorooctowym wg przepisu Manuel (1939).

Sprawdzono rozpuszczalność tłuszczów w alkoholu abs., eterze, chloroformie, kwasie octowym lodowatym i pirydynie.

Białka wykrywano reakcją bromofenolową (Mazia i inni, 1953), reakcją żelazicjankową i metodą taninowo-żelazową (Gomori, 1952).

Zastosowano reakcję PAS na polisacharydy.

Obecność śluzów pektynowych wykazywano barwieniem czerwienią rutenową z dodatkiem amoniaku (pH 7—8) i błękitem metylenowym.

Jodek w jodku potasu pozwalał na ujawnienie plastydów obok elajoplastów.

Posługiwano się mikroskopem Lumipan Zeissa z urządzeniami do kontrastu fazowego i do polaryzacji.

OBSERWACJE

Występowanie i postać elajoplastów

W młodych stadiach rozwoju *A. rosea* elajoplasty występowały w skórce wszystkich organów. W siewkach obserwowano je w korzeniach, hypokotylu, liścieniach, kilku pierwszych liściach (w blaszkach i ogonkach).

Obok elajoplastów w komórkach występowały stale bądź leukoplasty, bądź chloroplasty, chondriosomy wydłużone i kuliste, sferosomy oraz kuleczki lipidowe. Nie było inkluzji lipidowych w plastydach.

W miarę rozwoju rośliny zjawianie się elajoplastów w częściach nadziemnych staje się mniej regularne. Można było stwierdzić ich obecność jeszcze w młodych liściach odziomkowych. Wielkość ich nie przekraczała wtedy 3 $\times$ 3 μ. Nie ma elajoplastów w wykształconych liściach ani w ich przylistkach. Nie obserwowano ich również w liściach z zewnętrznymi oznakami wirozy, które zawierały X-ciała (A. Wałek-Czernecka i M. Kwiatkowska 1960).

Elajoplasty stają się znowu stałym składnikiem komórki w organach kwiatowych. Na szczycie pędów kwiatowych spotyka się je w przylistkach w obrębie nie rozwiniętego jeszcze kwiatostanu. Z reguły występują zarówno w pąkach, jak i w rozwiniętych kwiatach, w kieliszku, w kielichu, płatkach (obok obecnych w tych organach X-ciał), również w zalążni i w nitkach pręcikowych.

W poszczególnych organach elajoplasty różnią się wyglądem. Najbardziej typowe obrazy elajoplastów, znane z opisów w literaturze, znajdujemy w skórce hypokotyla. Są to utwory ziarniste, kuliste lub owalne, silnie załamujące światło (tab. I, fig. 1, 5). Często otacza je szklista otoczka (tab. I, fig. 6). Ziarnistości nadające charakterystyczny wygląd elajoplastom oglądane w Lumipanie, z użyciem i bez użycia kontrastu fazowego, widoczne są jako czarne punkty na tle jaśniejszego podłoża.

W strumieniach cytoplazmy elajoplasty poruszają się wolno. Wykazują jednocześnie ruch obrotowy i drgający, co utrudnia ich fotografowanie.

Wielkość elajoplastów w hypokotylu *A. rosea* waha się od 12 $\times$ 12 μ do 5,5 $\times$ 5,5 μ, w odmianie o kwiatach żółtych dochodziła do 20 $\times$ 12 μ. Elajoplasty występują we wszystkich komórkach skórki zwykle pojedynczo, rzadziej po 2 i więcej, wtedy są mniejsze.

W hypokotylach siewek hodowanych przez dłuższy czas w szalkach Petriego widoczne są elajoplasty z 1 lub kilku wodniczkami, elajoplasty w postaci wypukłych ziarnistych krążków z szerokim otworem pośrodku (tab. I, fig. 4), wreszcie przypominające wyglądem grona winorośli, owoce maliny lub morwy (porówn. tab. I, fig. 9, 11, 14, 15, 18 przedstawiające podobne elajoplasty w skórce organów kwiatowych). Zachowują się w nich nieliczne ziarnistości.

Dla organów kwiatowych, kielicha, kieliszka, płatków charakterystyczny jest typ elajoplastów w postaci gron, przechodzących w luźne skupienia kul (tab. I, fig. 11, 12, 14, 15, 18). Pojedyncze kule mogą odrywać się od elajoplastu, kiedy indziej rozpada się cały elajoplast. W tych samych organach, w pąkach, znajdują się ziarniste jeszcze elajoplasty (tab. I, fig. 2, 3, 17), a także różne formy przejściowe (tab. I, fig. 7, 8, 13). W kie-

liszku rozwiniętych kwiatów spotyka się elajoplasty podobne do opisanych w hypokotylu starzejących się kultur (tab. 1, fig. 3), to znaczy zawierające wodniczek pośrodku. W nitkach pręcikowych i w zalążniach elajoplasty są stosunkowo drobne, ziarniste lub już groniaste. W sąsiadujących ze sobą komórkach spotyka się obydwie formy elajoplastów (tab. 1. fig. 10).

Obrazy przyżyciowe różnych stadiów rozwoju pyłku (tetrady, mikrospory i młode ziarna pyłkowe) pokrywały się z podanymi przez jedną z nas w pracy z 1928 r. (Luxenburgowa 1928). Lepsze warunki obserwacji (Lumipan, kontrast fazowy) ułatwiły rozróżnienie zgrupowań ziarenek silnie załamujących światło, występujących we wszystkich wspomnianych stadiach oraz śledzenie stopniowych ich przemian, nie przyniosły jednak nowych faktów.

W korzeniach elajoplasty w strefie granicznej w hypokotylach są wielkie, płaskie (tab. II, fig. 2, 3, 4). Każdy niemal typ komórek na szczycie korzenia charakteryzuje się odmienną postacią i układem elajoplastów. Omówimy je w związku z opisem elajoplastów.

Podkreślano niejednokrotnie, że elajoplasty nie występują w komórkach szparkowych (Raciborski, 1895, Wóycicki 1929, Weber 1955 i inni). U *A. rosea* w szparkach nie ma również elajoplastów uformowanych podobnie jak w innych komórkach skórki. Występują tu jednak charakterystyczne zgrupowania ziarnistości leżące jakby w pęcherzykach (tab. III, fig. 7 i 8). Po dodaniu Sudanów czerwonych w roztworze alkoholowym całe pęcherzyki tworzą czerwoną kroplę. Pod wpływem czterotlenku osmu pęcherzyki stają się brunatne, ziarnistości czarne. Należy przypuszczać, że wyżej opisane utwory pęcherzykowate są zaczątkami elajoplastów, które dalej się nie wykształciły.

Poza *Althaea rosea* i *M. neglecta* znaleziono elajoplasty u następujących przedstawicieli *Malvaceae*: *Althaea officinalis*, L., *Malope trifida* Cav., *Lavatera thuringiaca* L., *Malva pusilla* Sm., *Malva mauritiana* L., *Malva silvestris* L., *Sidalcea candida* A. Gr. We wszystkich tych roślinach elajoplasty były podobne do opisanych u *A. rosea*. Różnice sprowadzały się do wcześniejszego lub późniejszego przechodzenia elajoplastów ziarnistych w formy podobne do gron lub w pojedyncze kule. Poza tym wielkość elajoplastów była niejednakowa. W hypokotylu roślin wykiełkowanych z nasion elajoplasty były zawsze ziarniste.

Charakter chemiczny elajoplastów w hypokotylu *A. rosea*

Dominującym składnikiem elajoplastów są lipidy. Wśród nich przeważają tłuszcze obojętne. Barwią je Sudany czerwone i czerwień oleista, błękit Nilu 1% (na różowoczerwono) w preparatach utrwalonych metodą

Bakera i w materiale świeżym. Poza tym występują w elajoplastach fosfolipidy stwierdzone testem kwaśnej hemateiny i metodą Feyrtera. Obecność fosfolipidów (lecytyn) potwierdza także powstawanie przy uwodnieniu form myelinowych (Revel i inni, 1958), których błonki barwią się na niebiesko błękitem Nilu na materiale świeżym i utrwalonym.

Występowanie kwasów tłuszczowych zostało stwierdzone na podstawie dodatniej reakcji Fischlera oraz Barrolliera i Suchowsky'ego.

Na lipidy nienasycone wskazuje zachowanie się elajoplastów wobec kwasu osmowego. Już po 1—2 sek działania par następowało wyczernianie ziarenek w elajoplastach, po dłuższym działaniu cały elajoplast stawał się jednolicie czarny.

Dodatni wynik reakcji PFAS dowodzi, że w elajoplastach występują fosfolipidy nienasycone.

Reakcja Molischa doprowadziła do zmydlania tłuszczów. Pod działaniem mieszaniny KOH i amoniaku następowało rozpadanie się elajoplastu, a po 2 dniach powstawały w komórce dwójłomne kryształy w postaci igiełek różnej długości (Molisch 1923).

Nie wykryto w elajoplastach lipidów acetalowych. Ujemnie wypadły reakcje na sterole i ich estry, wymienione przy opisie metod stosowanych w pracy. Nie stwierdzono również obecności polisacharydów posługując się reakcją PAS.

Lipidy zawarte w elajoplastach rozpuszczają się w alkoholu abs., eterze, chloroformie, ksylenie. W acetonie rozpuszczanie tłuszczów jest tylko częściowe, co się tłumaczy obecnością fosfolipidów. Rozpuszczał lipidy również kwas octowy lodowaty, podobnie jak to się dzieje w przypadku lipidów u *Ricinus* i w chloroplastach kaktusów (Manuel 1936).

W elajoplastach występują substancje białkowe. W materiale utrwalonym alkoholem 96%, jako jedyny ślad elajoplastu, zachowuje się w komórkach zrąb siateczkowaty z mniej lub bardziej licznymi ziarenkami. Nici zrębu, które są różnej grubości, i ziarniste utwory barwią się na niebiesko po reakcji bromofenolowej (Mazia i inni 1953) i po reakcji żelazicjankowej, na szaroczarno po zastosowaniu metody taninowo-żelazowej (Gomori 1952).

Podobny szkielet elajoplastów widoczny jest w preparatach w balsamie kanadyjskim z materiału utrwalonego w płynach Regaud, Nawaszina i Lewickiego, barwionych hematoksyliną żelazową Heidenhaina lub kwaśną fuksyną wg Altmanna (tab. III, fig. 10).

W elajoplastach występują również i śluzy pektynowe, które błękit metylenowy barwił na fioletowo, a czerwień rutenową — na różowoczerwono.

Przekształcanie się ziarnistych elajoplastów

W żywych komórkach oglądanych w różnych środowiskach obserwowano powstawanie elajoplastów w postaci gron lub skupionych kul z form ziarnistych. W przemianach tych bierze udział zarówno podłoże elajoplastu, jak i tkwiące w nim ziarenka.

W pierwszym etapie może odgrywać główną rolę podłoże. Powierzchnia elajoplastu staje się falista, powstają wzdęcia, uwypuklenia (tabl. I, fig. 6 i 13), z których formują się banieczkowate kule — „formy myelinowe". Świecą one w świetle spolaryzowanym.

W pewnych warunkach otrzymano bardziej typowe figury myelinowe w postaci wydłużonych woreczków. Tego rodzaju wyrosty rurkowate zjawiały się na brzegach elajoplastów, np. w skrawkach badanych w rozcieńczonym roztworze jodu w jodku potasu lub w wodnym roztworze błękitu bromofenolu rtęciowego (stosowanego do reakcji na białka wg Mazia i innych). Identyczne obrazy obserwowano w materiale utrwalonym metodą McManusa, a nawet mieszaniną formalinowo-wapniową Bakera, chociaż chlorek wapnia, jak podaje Baker za Leathesem (Baker 1958), przeciwdziała tworzeniu się form myelinowych (tab. I, fig. 16).

Wypływaniu kul towarzyszy zjawianie się wewnątrz elajoplastu jamistości — wodniczków. Kule pęcznieją, zlewają się ze sobą, w ostatecznym efekcie elajoplast przekształca się w grono (tab. I, fig. 9—15, 18). Błękit Nilu 1% barwi zawartość kul na różowoczerwono, czasem na fioletowo, obramowanie ich zaś na niebiesko. Podobne zabarwienie wykazują wydłużone figury myelinowe w elajoplastach utrwalonych formalinowo-wapniową mieszaniną Bakera. Jod w jodku potasu barwi kule na żółto z ciemniejszym odcieniem warstewki obwodowej, czerwień rutenowa na różowoczerwono, przy czym zabarwiona jest wyraźniej powłoka zewnętrzna, słabiej wnętrze, które ma często odcień żółtawy.

Błękit metylenowy, błękit trypanowy, czerwień obojętna barwią słabo kule wypływające z elajoplastów za życia komórki, tzn. kiedy cykloza występuje, intensywniej zaś w komórce martwej. Wszystkie barwniki użyte były w bardzo słabych roztworach. Po dodaniu Sudanów czerwonych w alkoholowym roztworze całe grona barwią się na czerwono, zlewając się natychmiast w jedną lub kilka kropli. Bardzo sugestywne, wskazujące na pochodzenie form myelinowych z podłoża elajoplastu, są obrazy przedstawione na tabl. I, fig. 7, 8. Wielkie pęcherze wydobywają się z jednej strony elajoplastu, który poza tym jest ziarnisty.

Inny nieco jest przebieg deformacji elajoplastów ziarnistych, zapoczątkowany przez pęcznienie ziarenek tkwiących w elajoplaście. Pęcznienie jest stopniowe, obejmuje z początku pojedyncze ziarenka, potem coraz liczniejsze (tabl. III, fig. 1—6). W powstałych kuleczkach, zwiększających

stopniowo swoje rozmiary, następuje odmieszanie, w wyniku czego tworzą się pęcherzyki kuliste, które w przekroju optycznym mają wygląd obrączek. Składnik bardziej gęsty, silniej załamujący światło zbiera się na powierzchni. Kiedy indziej skupia się on tylko w pewnej partii warstwy zewnętrznej dając w przekroju optycznym obrazy sierpa czy też półksiężyca. Niekiedy substancje silniej załamujące światło występują na dwóch biegunach pęcherzyka, który jest teraz eliptyczny. Kiedy pęcherze pęczniejąc i rosnąc w dalszym ciągu stykają się ze sobą, ten właśnie składnik ziarnistego utworu, który nie przeszedł do roztworu, tworzy grudki i pasemka przylegające do ścian — gąbczastego teraz — elajoplastu (tabl. III, fig. 2, 4). Otrzymuje się obrazy żywo przypominające elajoplasty w materiale utrwalonym. Część ziarnistości widocznych na ściankach sieci — to prawdopodobnie nie zmienione ziarenka, które tkwiły w elajoplaście.

Nie jest wykluczone, że obydwa wyżej opisane procesy wzajemnie się dopełniają. W miarę postępującego uwodnienia zachodzi mieszanie się substancji 2 składników elajoplastów, to znaczy utworów ziarnistych i podłoża.

Powstawanie elajoplastów

Powstawanie i rozwój elajoplastów badano: 1) w wierzchołkach młodych korzonków *A. rosea* i *M. neglecta*, 2) w hypokotylach siewek 5—6-dniowych *A. rosea*, hodowanych w ciemności.

W pierwszym przypadku posługiwano się preparatami gniecionymi. Przygotowano je bądź z odciętych wierzchołków korzeni rozgniatanych w kropli wody, bądź z korzonków utrwalanych uprzednio w czterotlenku osmu (opis postępowania na str. 346). Pewne usługi oddały nam skrawki parafinowe z materiału utrwalonego metodą Mevesa i McManusa, barwione hematoksyliną żelazową, kwaśną fuksyną lub Sudanem czarnym B.

Na preparatach gniecionych znaleziono wszystkie stadia tworzenia się elajoplastów. W najmłodszych komórkach merystematycznych występowały nieliczne ziarenka i kropelki, silnie załamujące światło, pojedyncze lub w małych grupkach po 2—4. Wszystkie były osmofilne i sudanofilne. Przy barwieniu Sudanami czerwonymi lub Sudanem czarnym w alkoholowym roztworze następowało natychmiastowe zlewanie się poszczególnych ugrupowań. Błękit Nilu 1% barwił niektóre kuleczki na czerwono, inne na niebiesko. W starszych komórkach widoczna już była większa ilość grup złożonych każda z 3—6 ziarenek. Ilość osmofilnych ziarenek wzrasta w miarę różnicowania się komórek, tworzą też większe i bardziej zbite skupienia. Na fig. 2, 3 i 4 tabl. IV przedstawiających komórki merystemu wierzchołkowego korzonków utrwalonych w parach OsO_4 można

znaleźć wszystkie etapy skupiania się ziarenek osmofilnych w okolicy jądra. Z początku nawet większe ugrupowania są nieregularnych kształtów bez wyraźnego konturu. W komórkach skórki, gdzie już wykształciły się duże leukoplasty zawierające skrobię, „elajoplasty", to znaczy skupienia osmofilnych ziarenek, są płaskie, nieforemne, raczej wielokątne. Oblepiają one dosłownie jądro. Pomiędzy nimi leżą leukoplasty odcinające się wyraźnie po zabarwieniu jodem w jodku potasu preparatu utrwalonego czterotlenkiem osmu.

W strefie przejściowej, między korzeniem a hypokotylem, widzimy już uformowane elajoplasty z dobrze zarysowanym konturem, ale jeszcze różnej wielkości i kształtów. Są zawsze płaskie. Często przylegają do jądra, które otaczają wielkimi płatami, powstającymi ze zlania się poszczególnych mniejszych elajoplastów (tabl. II, fig. 1 i 2). Pod mikroskopem obserwowano w żywych komórkach różne etapy ześlizgiwania się z jądra tego rodzaju wklęsłych miseczkowatych elajoplastów. Również na pozostałym terenie komórki można znaleźć stadia zlewania się mniejszych elajoplastów w większe (porównaj tabl. II, fig. 3 i 4). Dalszy krok w rozwoju elajoplastów, który zazwyczaj odbywa się dopiero w hypokotylu, to przekształcanie się płaskich ziarnistych skupień w kuliste elajoplasty. W wierzchołku korzenia kuliste elajoplasty występują w komórkach czapeczki i w zróżnicowanych komórkach skórki (tab. IV, fig. 5 i 6).

Preparaty parafinowe z korzeni utrwalonych metodą Mevesa, McManusa itp. potwierdziły powyższe obserwacje. Rozkład i udział elementów osmofilnych i sudanofilnych w różnych strefach korzenia był analogiczny. Wyróżnienie szczegółów stało się jednak trudniejsze. Pod wpływem utrwalania i barwienia nastąpiło częściowo zlanie się ziarnistych utworów w poszczególnych skupieniach i różna deformacja tych ostatnich (porównaj tabl. IV, fig. 1).

Powstawanie elajoplastów z drobnych ziarnistych utworów obserwowano również w żywych komórkach, a mianowicie w skórce hypokotyli wyhodowanych w ciemności.

Wypłonione hypokotyle, na 5—6 dzień po wykiełkowaniu nasion, osiągały długość ponad 5 cm, podczas gdy liścienie były jeszcze ukryte w rozłupkach. Formowanie się elajoplastów opóźniało się w porównaniu z roślinami w kulturach na świetle. W cytoplazmie występowały liczne sferosomy (średnicy 0,3—0,6 μ) obok większych kuleczek, o których trudno było orzec, czy są sferosomami, czy kuleczkami tłuszczu: własności optyczne miały takie same. W komórkach, w których cykloza była energiczna, drobne te ciałka płynące w strumieniach cytoplazmy skupiały się w okolicy jądra. Patrząc na jądro z góry, widziało się na jego tle pojedyncze ziarenka oraz ziarenka połączone po 3—6 w charakterystyczne łańcuszki i większe już zgrupowania, które wzrastały w oczach przez do-

łączania się dalszych ziarenek. Czasem od razu występowały większe skupienia. W sąsiadujących ze sobą komórkach formowanie się elajoplastów było na różnym etapie, tak że na jednym skrawku znajdowano wszystkie obrazy opisane w korzeniu.

Na tle jąder występowały niekiedy charakterystyczne grupy kilku ziarenek ułożonych na powierzchni drobnych pęcherzyków (wodniczków?) lub w kątach małych wieloboków. Bardzo frapujące były obrazy powstawania tych zgrupowań z prostych łańcuszków. W preparacie oglądanym w oleju parafinowym widziano, jak łańcuszek składający się z 4—6 ziarenek zginał się raptownie, przełamywał, po czym następowało przemieszczanie się ziarenek, zjawiały się pęcherzyki bądź wieloboczne ciała.

Podobne skupienia ziarenek na powierzchni lub wewnątrz pęcherzyków obserwowano w komórkach zamykających szparek (tabl. III, fig. 7 i 8), w skórce organów kwiatowych, w których występowały elajoplasty w postaci gron (tabl. III, fig. 9), a także w tetradach i mikrosporach. Pod działaniem Sudanów w alkoholowym roztworze następowało, jak zwykle, zlewanie się skupień w kroplę zabarwioną.

Rozpadanie się elajoplastów dostarcza dalszych dowodów, że elajoplasty utworzone są ze skupienia ziarenek i kuleczek osmofilnych. Jest to niejako odwrócony obraz powstawania elajoplastów. U *A. rosea* obserwuje się samorzutny rozpad elajoplastów w starszych kulturach 10—14-dniowych, u *M. neglecta* już w kilka dni po wysianiu nasion. Proces ten zachodzi szybciej w ciemności.

Przebieg rozpadania się elajoplastów, obserwowany pod mikroskopem, jest następujący. W komórkach, gdzie ruch cytoplazmy jest żywy, odrywają się od elajoplastów grupy ziarnistości (wśród nich znajdują się i większe kropelki tłuszczowe (tabl. V, fig. 1, 3, 4). Oderwane fragmenty mogą wtórnie przybierać postać kulistą (tabl. V, fig. 2). Powstają nowe elajoplasty — na ich powierzchni zbiera się niekiedy żelatynowata substancja, tworząc rodzaj otoczki. Często mniejsze fragmenty, oderwane od elajoplastu macierzystego, zlewają się ze sobą, tworząc większe skupienia. Kiedy indziej rozpadają się zupełnie (tabl. V, fig. 5, 6). Proces ten zachodzi szybko. Masa skupionych z początku ziarenek i kuleczek — jest ich setki — wypływa z elajoplastu na zewnątrz i, unoszona przez strumienie cytoplazmy, rozprasza się stopniowo w komórce. Nie można ich wtedy odróżnić od sferosomów i kuleczek tłuszczu, które stanowią stałe składniki komórki.

W okresie rozpadania się elajoplastów ilość ziarnistych utworów w komórce wyraźnie wzrasta. Różnica ta zawsze się zaznacza, kiedy w preparacie występują obok siebie komórki zawierające normalne elajo-

plasty i już elajoplastów pozbawione. Ziarniste utwory wysypujące się z elajoplastów redukują czterotlenek osmu.

Charakter ziarnistych składników elajoplastów

Część kulistych ciałek osmofilnych w rozpadających się elajoplastach to kuleczki lipidowe. Zgodnie ze zdaniem Steffena można je zidentyfikować, jeżeli wielkość ich przekracza 1 μ (Steffen 1953). Ale zdarzają się i mniejsze kropelki tłuszczu, tych nie można odróżnić od pozostałych ziarenek osmofilnych. Średnica ziarenek osmofilnych wynosi 0,3—0,5 μ, po napęcznieniu w wodzie dochodzi nawet do 0,8 μ. Pomiary robiono: w ziarnistych elajoplastach, w stadium rozpadania się tych ostatnich oraz w okresie skupiania się ziarenek przy powstawaniu elajoplastów.

Ziarnistości osmofilne mają własności optyczne kulistych utworów silnie załamujących światło, to znaczy są czarne w kontraście fazowym, ze zmianą barwy z czarnej na jasną kiedy są w ruchu, silnie uginają światło, wykazując typowe „halo". Cechy te, uważane niekiedy za specyficzne dla sferosomów (Sorokin H. P. 1955, Sorokin H. P. i Sorokin S. S. 1956), właściwe są i drobnym kuleczkom lipidowym, nie stanowią więc kryterium, które by pozwoliło rozróżnić te dwie kategorie utworów Inne właściwości charakteryzujące ziarenka osmofilne rozpadających się, a także powstających elajoplastów — to szybki ruch w strumieniach cytoplazmy, szybszy niż elementów chondriomu, oraz tendencja do układania się w łańcuszki po 2—5. Są to, jak wiadomo, cechy przypisywane sferosomom (Sorokin H. P. 1955, Sorokin H. P. i Sorokin S. S. 1956, i inni).

Na podstawie preparatów utrwalonych metodą McManusa, barwionych Sudanem czarnym, oraz na podstawie testu kwaśnej hemateiny Bakera, można wnioskować, że ziarenka leżące w elajoplastach zawierają fosfolipidy. Po zabarwieniu skrawków całe elajoplasty tworzą czarne bądź ciemnoniebieskie plamy, w starych jednak preparatach podłoże staje się bledsze i wtedy od jaśniejszego tła odcinają się czarne lub granatowe punkciki. Niewątpliwie występują w ziarenkach lipidy nienasycone, wśród nich trójglicerydy (patrz wyżej: barwienie Sudanami czerwonymi ziarnistości skupiających się w elajoplasty, natychmiastowa redukcja OsO_4 — Baker 1958 oraz nienasycone fosfolipidy — reakcja PFAS).

Celem stwierdzenia, czy w ziarenkach osmofilnych poza lipidami występują i substancje białkowe, użyto metody Pernera stosowanej do barwienia sferosomów (Perner 1952, 1953, 1958). Polega ona na barwieniu skrawków barwnikami zasadowymi (rozaniliną, błękitem Viktoria lub

pironiną) po uprzedniej ekstrakcji ksylenem lipidów. Metoda ta zawiodła jednak w zastosowaniu do ziarenek tkwiących w nie naruszonych elajoplastach. Okazało się bowiem, że jednolite zaczernienie elajoplastów wywołane parami OsO_4 nie znikało w ksylenie nawet po 2 tygodniach. Udało się natomiast zabarwić tą metodą utwory w komórkach z rozsypanymi już elajoplastami. Skonstatowano, że w komórkach tych było więcej wybarwionych ziarnistości niż w sąsiednich, zawierających nie zmienione elajoplasty.

Lepsze wyniki uzyskano wprowadzając pewne modyfikacje do metody Pernera. Po utrwaleniu skrawków w parach czterotlenku osmu (10—20 min), płukano je w wodzie wodociągowej — zmienianej kilkakrotnie — w ciągu 1/2 godziny, po czym poddawano je działaniu kwasu nadmrówkowego (przygotowanego jak do reakcji PFAS).

Kwas nadmrówkowy wybielał elajoplasty, rozpuszczał częściowo tłuszcze i powodował rozsypywanie się elajoplastów. Przy dostatecznie krótkim działaniu kwasu nadmrówkowego (kilka sekund) można było uchwycić moment, kiedy elajoplasty już się rozpadły, ale wypływające z nich ziarenka i kuleczki były jeszcze skupione. Dzięki temu dawały się odróżnić od bardziej równomiernie rozproszonych w cytoplazmie sferosomów i kuleczek tłuszczu. Preparaty z rozsypującymi się elajoplastami przemywano w wodzie destylowanej (kilka razy zmienianej), następnie przenoszono do pirydyny (w temp. 60°C) na 17—24 godz. Po przemyciu ponownym w wodzie wodociągowej (2 godz) skrawki barwiono roztworami (1 : 1000) rozaniliny, błękitu Viktoria lub pironiny w ciągu 1 godziny, płukano wodą i zamykano w glicerynie z żelatyną lub w glicerynie. Można też było barwić skrawki dłużej, różnicując je następnie w HCl 1n. Komórki po pirydynie były zniszczone, ale skupienia zabarwionych ziarenek były widoczne. Najlepsze wyniki dawało barwienie rozaniliną.

Podłoże elajoplastów

Jakie jest podłoże elajoplastów, to znaczy, jakie substancje spajają osmofilne ziarenka i otaczają niekiedy szklistą powłoką całe elajoplasty? Niewątpliwie występują w podłożu białka. Jak podano wyżej, po rozpuszczeniu lipidów, na terenie elajoplastów obok drobnych ziarenek pozostaje ciało gąbczaste lub siateczkowate, które daje reakcje na białka. W preparatach trwałych ze skórki różnych organów, utrwalonej metodą Mevesa (preparaty odbarwiano wodą utlenioną), Nawaszina lub Regaud, występuje ten sam szkielet elajoplastów czasem piankowaty, kiedy indziej w postaci siateczki mniej lub bardziej zbitej, czerwonej w materiale barwionym kwaśną fuksyną Altmanna, szaroczarnej po hematoksylinie.

W podłożu znajdują się w dużej ilości lipidy nienasycone, prawdopodobnie głównie trójglicerydy. Wskazuje na to jednolite zabarwienie całych elajoplastów po krótkim nawet działaniu czterotlenku osmu i po utrwaleniu w płynie Mevesa, który zawiera OsO_4 w obecności silnego utleniacza (Baker 1958). Podczas usuwania 3% wodą utlenioną sczernień elajoplastów, utrwalonych w parach osmu, najpierw znika zabarwienie podłoża, dopiero po jakimś czasie stają się bezbarwne tkwiące w nim ziarenka. Można więc w pewnym momencie zabarwić Sudanami czerwonymi tylko podłoże. Powstawanie figur myelinowych dowodzi występowania w podłożu fosfolipidów (lecytyn).

Inny dowód obecności fosfolipidów — to zabarwienie całego elajoplastu Sudanem czarnym po utrwaleniu metodą McManusa i kwaśną hemateiną wg Bakera. W obydwu przypadkach elajoplasty są często otoczone czarną wąską obwódką — byłby to odpowiednik szklistej otoczki obserwowanej w świeżym materiale.

Wreszcie podłoże zawiera śluzy pektynowe, które wykazały specyficzne zabarwienie czerwienią rutenową i błękitem metylenowym (fioletowe).

Śluzy pektynowe występują jako kropelki wśród innych, nie zabarwionych ziarenek elajoplastów, w otoczce galaretowatej — zwykle tylko w pewnych jej partiach — i w wodniczkach na terenie elajoplastów.

Już w małych pęcherzykowatych skupieniach, o których wspomniano wyżej, można było wyróżnić podłoże. Barwiło się ono na różowo czerwienią rutenową (ziarenka były bezbarwne), również na różowo barwiło się błękitem Nilu 1% (ziarenka zabarwione na niebiesko), na brunatno kwasem osmowym (ziarenka czarne). Charakter wybarwiania się tła pęcherzyków wskazywałby na obecność śluzów i tłuszczów obojętnych.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Elajoplasty u ślazowatych występują tylko w pewnych okresach życia rośliny. Są one właściwe jej młodym stadiom; wcześnie, bo już w hypokotylu, osiągają najwyższy stopień wykształcenia i maksymalne rozmiary, po czym zaczyna się ich stopniowa degeneracja. Drugi okres zjawiania się elajoplastów — to okres kwitnienia rośliny. I teraz najwyższy ich rozwój przypada na młode organy, jeszcze w pąku.

Wbrew opiniom dawniejszych botaników elajoplasty nie dzielą się. „Bierny podział", pączkowanie (Raciborski 1895, Politis 1911), to już pierwsze stadium ich rozpadu.

Organy tak nietrwałe, niezdolne do autoreprodukcji, nie mogą być uważane za odpowiedniki plastydów.

Nie można też elajoplastów uważać za produkt degeneracji plastydów. Nie da się to pogodzić z ich zjawianiem się w młodych organach w okresie intensywnego wzrostu. Obok elajoplastów w komórce zawsze występują bądź leukoplasty, bądź chloroplasty. Nie ma form przejściowych. U ślazowatych plastydy w żadnym okresie nie zawierają inkluzji tłuszczowych.

Powstawanie elajoplastów u ślazowatych dowodzi, że nie są to również składniki komórki homologiczne z plastydami. Nie ma związku genetycznego między tymi dwiema kategoriami utworów.

Różne były poglądy na pochodzenie elajoplastów u wyższych roślin. Przeważnie wiązano ich powstawanie z plastydami (Lundström 1888, Wakker 1888, Beer 1909, Faul 1935, Thaler 1956). Wg Wóycickiego (1929) elajoplasty powstają z połączenia „oleoplastów", które mają postać mitochondriów Guilliermonda. Politis wywodził je z jądra.

Inny typ poglądów reprezentuje Raciborski, Caruso i Guilliermond. Raciborski (1895) uważał, że elajoplasty wykształcają się wśród plazmy i że ich homologami są raczej wszystkie kulki oleiste. Zdaniem Guilliermonda (1921, 1922) elajoplasty są aglomeratem kuleczek lipoidowych. Podobne stanowisko zajmuje L. Caruso (1938). Nie jest wykluczone, że pochodzenie elajoplastów u różnych roślin jest niejednakowe.

U *Malvaceae* elajoplasty powstają na drodze skupiania się ziarenek osmofilnych i sudanofilnych. W wierzchołku korzenia *A. rosea* i *M. neglecta*, gdzie rozwój elajoplastów przebiega równolegle do różnicowania się komórek, wykazałyśmy kolejne stadia tworzenia się elajoplastów, począwszy od łączenia się nielicznych ziarenek osmofilnych w drobne grupy, poprzez powstawanie większych skupień — aż do uformowanych już elajoplastów. Ten sam proces agregacji ziarenek osmofilnych udało się nam prześledzić krok za krokiem w żywych komórkach wypłonionych hypokotyli, u których rozwój elajoplastów był opóźniony.

Również obrazy elajoplastów rozpadających się samorzutnie lub pod wpływem kwasu mrówkowego potwierdzały pogląd, że są one skupieniami ziarenek osmofilnych i kuleczek tłuszczu.

Wyniki naszej pracy zbliżają nas do poglądów Guilliermonda. Elajoplasty u ślazowatych nie są jednak agregatami zwykłych kuleczek lipoidowych, jak to twierdzi Guilliermond; ich składniki ziarniste zawierają bowiem nie tylko lipidy, ale i substancje białkowe. W rozpadających się elajoplastach udało nam się ujawnić to podłoże białkowe ziarnistych utworów, barwiąc je — po rozpuszczeniu lipidów pirydyną —

barwnikami zasadowymi, które stosował Perner (1952) dla barwienia sferosomów, to znaczy rozaniliną, błękitem Viktoria, pironiną. Metodę tę uznałyśmy za bardziej miarodajną dla naszego materiału niż metoda Pernera, gdyż dawała pełną gwarancję całkowitego usunięcia lipidów. Obecność składnika białkowego w ziarenkach elajoplastów potwierdziła również reakcja bromofenolowa (Mazia i inni).

Z uwagi na dwoisty charakter, to znaczy obecność składnika białkowego obok lipidów, ziarnistości osmofilne elajoplastów przypominają sferosomy. Jako cechy wspólne należy wymienić podobną wielkość, kształt, to samo zachowanie optyczne. W strumieniach cytoplazmy ruch ziarenek osmofilnych jest szybszy niż innych składników komórki, co, jak wiadomo, charakteryzuje sferosomy. Układają się podobnie jak sferosomy w łańcuszki po 2—4.

W odróżnieniu od sferosomów ziarenka osmofilne są mało trwałe, łatwo pęcznieją. Przy degradacji, która zachodzi w elajoplastach jeszcze żywej komórki, w napęczniałych ziarenkach następuje odmieszanie, wtedy mogą się one ze sobą zlewać. Jak wiadomo, nie było dotąd obserwowane ani pęcznienie, ani zlewanie się sferosomów (Perner 1953, Höfler i Url 1958), raczej ulegają one rozpuszczeniu i stają się niewidoczne. W HCl 1/1000 n dopiero po dłuższym czasie następuje ich zlewanie się ze sobą (Perner 1958). Dalsza różnica dotyczy zachowania się wobec takich barwników, jak Sudany i błękit Nilu. Barwią one ziarenka osmofilne już w materiale świeżym, sferosomy dopiero po utrwaleniu (Perner 1952). Dowodzi to, że przynajmniej część lipidów w ziarenkach osmofilnych jest nie maskowana.

Wszystkie wyżej wymienione własności, którymi różnią się ziarenka osmofilne elajoplastów od sferosomów, dałyby się wytłumaczyć przy założeniu, że są to sferosomy wzbogacone w substancje tłuszczowe. W komórkach malw, zawierających duże ilości tłuszczów (w preparatach w wodzie, a zwłaszcza w oleju parafinowym, tłuszcze wyciekają z komórek), istnieją warunki sprzyjające podobnemu nagromadzeniu się lipidów.

Tu nasuwa się pewna analogia z kuleczkami lipoidowymi, występującymi jakoby prawie we wszystkich komórkach zwierzęcych (Baker 1957), zwłaszcza z tą ich kategorią, która wiąże się z wytwarzaniem tłuszczów (Worley Z. G. i Worley A. K. 1943, Nath i inni 1959). Kuleczki lipidowe komórek zwierzęcych mają zbliżony skład (Baker 1957), niektóre zawierają również białka, np. występujące w komórkach nerwowych u *Gasteropoda* (Chou 1957, podaję za Bakerem 1957) oraz we wczesnych stadiach rozwoju oocytów u *Orthoptera* (Nath i inni, 1959).

Wyniki niniejszej pracy nie pozwalają na ostateczne zidentyfikowanie ziarnistych komponent elajoplastów. Ograniczono się na razie do analizy

cytochemicznej ziarenek pochodzących z elajoplastów. Konieczne są dalsze badania porównawcze, które objęłyby i inne składniki morfotyczne komórki.

U wyższych roślin charakter składników oleistych elajoplastów został ustalony zaledwie w kilku przypadkach. U wszystkich zbadanych roślin stwierdzono lipidy, tylko u *Cyclanthera pedata* Riss (1918) znalazł olejki eteryczne. W skórce tulipanów występują tłuszcze obojętne i lipoidy (Guilliermond 1919); elajoplasty *Funkia subovata* i *Vanilla planifolia* zawierają lipoidy, tłuszcze obojętne i kwasy tłuszczowe (Guilliermond 1922). U tej ostatniej rośliny Thaler znajduje obok fosfolipidów również i acetalfosfatydy (Thaler 1956). W elajoplastach goryczek występują tylko tłuszcze obojętne i lipoidy (Kwiatkowska 1959).

W pracy niniejszej stwierdzono w elajoplastach hypokotyla *A. rosea* obecność tłuszczów obojętnych, fosfolipidów, kwasów tłuszczowych. Charakterystyczny dla malwowatych jest duży udział związków nienasyconych. Dodamy, że kwasy tłuszczowe, wśród nich kwas nienasycony, były wykazane metodą chromatograficzną w liściach i nasionach ślazowatych (Shenstone A. J., Vickery 1957).

Śluzy pektynowe, które znaleziono w elajoplastach hypokotyla *A. rosea*, związane są również ze specyfiką materiału.

Jeszcze mniej zajmowano się dotąd podłożem elajoplastów. Kilkakrotnie stwierdzono jego charakter białkowy — plazmatyczny (Wakker 1888, Raciborski 1895, Luxenburgowa 1927, 1928, Wóycicki 1929). Guilliermond, dając opis tworzenia się elajoplastów przez aglomerację kuleczek lipoidowych, nie tylko nie wspomina o podłożu, ale nawet podkreśla specjalnie brak składnika białkowego w elajoplastach (Guilliermond 1922).

Badania nasze wykazały, że w podłożu elajoplastów u ślazów występują białka, różne lipidy, wśród nich dużo związków nienasyconych oraz śluzy pektynowe.

Pozostaje kwestią otwartą, skąd się biorą te składniki podłoża. Czy pochodzenie tłuszczów związane jest z ziarenkami osmofilnymi — byłaby to dalsza analogia z komórkami zwierzęcymi — czy też skupianie się ziarenek osmofilnych zachodzi na terenach wydzielonych cytoplazmy wokół wodniczków śluzowych lub lipidowych. Wydaje się nam interesujący fakt, że już w skupieniach, składających się zaledwie z kilku ziarenek, można było wykazać podłoże zawierające bądź lipidy, bądź śluzy.

Proces powstawania elajoplastów w kształcie gron z form ziarnistych przypomina analogiczne powstawanie figur myelinowych w chloroplastach (Weber 1935, Frey Wyssling 1956). I tu i tam udział w procesie bierze podłoże (stroma chloroplastu) i ziarniste utwory — to znaczy

grona w chloroplastach (Frey Wyssling 1956), ziarenka osmofilne w elajoplastach. Podobnie jak w chloroplastach również i w elajoplastach następuje w czasie pęcznienia zmieszanie treści obydwóch składników.

Nazwa „elajoplast" nie jest uzasadniona w zastosowaniu do utworów opisanych przez nas u *Malvaceae*. Utwory te nie są plastydami i nie pochodzą z plastydów. Mimo tego zastrzeżenia zachowujemy na razie ten termin ze względu na jego priorytet, a także z uwagi na to, że jest najczęściej stosowany i najbardziej ogólny. Sądzimy, że dopiero po ostatecznym stwierdzeniu pochodzenia i roli elajoplastów występujących u różnych roślin będzie można przystąpić do ustalenia wśród nich odrębnych kategorii, którym wypadnie nadać specjalne nazwy.

STRESZCZENIE

1. Stwierdzono występowanie elajoplastów w komórkach skórki u *Althaea rosea* (L.) Cav., *A. officinalis* L., *Malva neglecta* Wallr., *M. mauritiana* L., *M. silvestris* L., *M. pusilla* Sm., *Lavatera thuringiaca* L. i *Sidalcea candida* A. Gr.

Elajoplasty występowały w skórce wszystkich młodych organów wegetatywnych, były też stałym składnikiem komórki we wszystkich organach kwiatowych.

2. W poszczególnych organach *Althaea rosea elajoplasty* różnią się wyglądem. W hypokotylu są kuliste lub owalne, ziarniste, silnie załamujące światło, często otoczone szklistą powłoką. Dla organów w rozwiniętych kwiatach charakterystyczne są elajoplasty w postaci gron przechodzących w luźne skupienia kul, a nawet już tylko pojedyncze kule. W pąkach zdarzają się i formy ziarniste. W korzeniu, tam gdzie już uformowały się elajoplasty, są one płaskie, wielkie, o nieregularnych kształtach.

3. W elajoplastach hypokotyli *A. rosea* występują tłuszcze, białka i w niewielkiej ilości śluzy pektynowe. Przeważają tłuszcze, wśród nich tłuszcze obojętne. Występują również fosfolipidy oraz kwasy tłuszczowe. Duży jest udział lipidów nienasyconych, wśród których stwierdzono trójglicerydy i fosfolipidy.

Wszystkie te składniki, z wyjątkiem kwasów tłuszczowych, których nie udało się bliżej zlokalizować, występują zarówno w podłożu elajoplastów, jak i w jego ziarenkach.

Lipidy rozpuszczają się w zwykłych rozpuszczalnikach tłuszczowych, ale również i w kwasie octowym lodowatym. Aceton rozpuszcza nie wszystkie lipidy.

4. Elajoplasty wszystkich postaci tworzą się z form ziarnistych. Przemiany, związane zawsze z uwodnieniem, odbywają się kosztem podłoża elajoplastu i kosztem tkwiących w nim składników ziarnistych. Z podłoża powstają „formy myelinowe", w postaci najczęściej kul-pęcherzy, świecących w świetle spolaryzowanym, w pewnych warunkach jako wyrosty rurkowate. Deformacja ziarnistych elajoplastów może być również zapoczątkowana przez stopniowe pęcznienie ziarenek leżących w elajoplastach, w których następuje odmieszanie — „Napfförmige Entmischung". Przy dalszym pęcznieniu pęcherzyki zlewają się ze sobą, tworząc większe kule. Oba opisane procesy dopełniają się wzajemnie, przy czym w miarę postępującej hydratacji następuje zlanie się treści obydwóch składników. W rezultacie powstają groniaste elajoplasty. Resztki odmieszanej, bardziej gęstej substancji tworzą grudki i pasemka na ścianach granicznych połączonych ze sobą pęcherzy. Część ziarenek elajoplastu może być zachowana w nie zmienionej postaci.

Tego rodzaju obrazy elajoplastów widoczne są przeważnie na materiale utrwalonym metodą Bouina, Nawaszina, Lewickiego, Mevesa, także McManusa, Regaud i Bakera mieszaniną formalinowo-wapniową.

Tylko OsO_4 użyty jako pary w roztworze 1—2% utrwala zawsze ziarniste elajoplasty w nie zmienionej postaci.

5. Elajoplasty u ślazowatych powstają przez agregację ziarenek osmofilnych i sudanofilnych, występujących w cytoplazmie komórek. Przebieg tego procesu obserwowano w wierzchołku korzeni *M. neglecta* i *A. rosea*. W miarę różnicowania się komórek merystemu wierzchołkowego zjawiały się kolejne stadia skupienia się ziarenek. W młodych komórkach merystematycznych występują nieliczne grupy składające się z kilku ziarenek. Następnie tworzą się większe agregaty, jeszcze bez wyraźnie zarysowanego konturu, ściśle przylegające do jądra. Zachodzi stopniowe zlewanie się mniejszych skupień w większe i odsuwanie się tych ostatnich od jądra. W rezultacie powstają wielkie, płaskie, nieforemne elajoplasty, charakterystyczne dla strefy przejściowej między korzeniem a hypokotylem. Ostatecznie ukształtowane elajoplasty, w których można wyróżnić obok ziarnistości i substrat, zjawiają się w hypokotylu.

Wszystkie stadia tworzenia się elajoplastów można było prześledzić w żywych komórkach skórki etiolowanych hypokotylów, w których powstawanie elajoplastów było opóźnione.

Obrazy rozpadania się elajoplastów potwierdziły również nasz pogląd o tworzeniu się elajoplastów drogą skupiania się ziarenek osmofilnych.

6. Ziarnistości osmofilne elajoplastów zbliżone są do sferosomów szeregiem cech, mianowicie przez: 1) te same własności optyczne, 2) wielkość (od 0,3—0,5 μ, większe, kiedy są napęczniałe, dochodzą wtedy do 0,8 μ), 3) szybkie poruszanie się w strumieniach cytoplazmy, 4) układanie się w charakterystyczne łańcuszki złożone z 2 do 6 ziarenek, 5) obecność obok lipidów składnika białkowego.

Różnice pomiędzy sferosomami a ziarnistościami osmofilnymi elajoplastów w hypokotylu są następujące: ziarnistości osmofilne elajoplastów barwią się już w świeżym materiale Sudanami i błękitem Nilu, są mniej trwałe i pęcznieją w wodzie. W powstałych pęcherzykach może następować odmieszanie.

7. Wysunięto przypuszczenie, że ziarnistości osmofilne malw są sferosomami wzbogaconymi w lipidy. Tłumaczyłoby to odrębne zachowanie się ziarnistości osmofilnych i sferosomów. Obfitość tłuszczów w komórce malw stwarza warunki sprzyjające nagromadzeniu się lipidów w sferosomach.

Wskazano również na pewną analogię między ziarenkami osmofilnymi elajoplastów a kuleczkami lipoidowymi, występującymi w komórkach zwierzęcych.

Katedra Anatomii i Cytologii Roślin
Uniwersytetu Łódzkiego

(Wpłynęło dn. 11.1.1961 r.)

RÉSUMÉ

1. On a constaté la présence des élaïoplastes dans les cellules épidermiques des espèces suivantes: *Althaea rosea* (L.) Cav., *A. officinalis* L., *Malva neglecta* Wallr., *M. mauritiana* L., *M. silvestris* L., *M. pusilla* Sm., *Lavatera thuringiaca* L., *Sidalcea candida* A. Gr.

Les élaïoplastes apparaissent toujours dans les organes jeunes, tels que les racines, les hypocotyles, les cotylédons et les jeunes feuilles; ils font défaut dans les organes végétatifs adultes, pour réapparaître ensuite dans toutes les pièces florales.

2. Les élaïoplastes d'*Althaea rosea* varient par leur forme et leur apparence suivant les divers organes de la même plante.

Dans l'hypocotyle ce sont les corps sphériques ou ovoïdes, granuleux, fortement réfringents, à contour net, revêtus souvent d'une gaine gélatineuse. Ils sont formés par le substratum homogène et les nombreuses granulations osmiophiles qui se révèlent comme points noirs, lorsque examinées in vivo en contraste de phase. Les élaïoplastes muriformes et en forme de grappe sont caractéristiques des organes des fleurs épanouies. Dans les diverses pièces du bourgeon floral, on rencontre encore des élaïoplastes granuleux. Dans la racine, au niveau, où les élaïoplastes sont déjà présents, ils sont grands, plats, de forme irrégulière.

3. Les élaïoplastes renferment des substances protéiques, des lipides et des mucilages pectiques — ceux-ci étant en très petite quantité. Les lipides sont les constituants les plus importants. Les triglycérides semblent prédominer. Ils sont accompagnés de phospholipides (lécithines) et d'acides gras. Les lipides non saturés, parmi lesquels on a décelé des graisses neutres et des phospholipides, sont très abondants. Tous ces constituants des élaïoplastes, sauf les acides gras, dont la localisation est plus difficile à affirmer et les substances pectiques qui se trouvent uniquement dans le substratum, ont élé révélés aussi bien dans le substratum que dans les granulations.

Les lipides sont solubles non seulement dans les solvants ordinaires des graisses, mais aussi dans l'acide acétique glacial. L'acétone ne dissout pas tous les lipides contenus dans élaïoplastes.

4. Les élaïoplastes de formes variées tirent leur origine des élaïoplastes à structure granuleuse. Le processus de transformation, accompagné toujours de l'hydratation, paraît s'effectuer suivant deux modes principaux, tantôt au dépens de substratum d'élaïoplaste, tantôt au dépens de ses inclusions granulaires. Dans le premier cas, on voit apparaître à la surface des élaïoplastes des „figures myeliniques" qui se présentent le plus souvent sous forme de vésicules-boules, dans certaines circonstances — de protubérences tubuleuses. D'autre part, la déformation peut être initiée par gonflement des granulations incluses dans le substratum qui conduit à leur vésiculisation. Au sein de vésicules, la séparation de phases („Entmischung") a lieu. Les vésicules s'accroissent, se fusionnent en formant des globules de plus en plus gros. Les deux precessus décrits se complètent mutuellement, il en résulte l'apparition des élaïoplastes muriformes, en forme de grappes ou de framboises ou même de simples grosses boules.

Les résidus de la matière plus dense „démêlée" forment des grains difformes ou des grumeaux accolés aux parois des boules vésiculeuses. Une partie de granulations de l'élaïoplaste peut persister à l'état non changé.

5. Les élaïoplastes des Malvacées se forment par l'agglomération de granulations osmio- et soudanophiles présentes dans le cytoplasme des cellules. Dans les tissus des racines *d'Althaea rosea* et de *Malva neglecta* on pouvait observer toutes les phases successives d'agrégation de granulations osmioréductrices. Dans les jeunes cellules méristématiques, on ne voit que de petits groupes composés d'un nombre restreint de granules, plus tard, au fur et à mesure que les cellules se différencient, les amas deviennent de plus en plus grands et nombreux. Difformes, sans contour net, ils adhèrent d'abord au noyau. Dans les stades plus avancés, ces amas se fusionnent à leur tour, ce qui conduit à la formation d'élaïoplastes énormes, aplatis, de formes irrégulières, qu'on voit dans la région intermédiaire entre la racine et l'hypocotyle. Les elaïoplastes s'éloignent du noyau, s'arrondissent, leur forme devient régulièrement sphérique. C'est dans l'hypocotyle que leur évolution est définitivement accomplie. Se ne sont plus de simples conglomérats de granulation, on y peut

discerner aussi un substratum et quelquefois une sorte de pellicule qui enveloppe l'ensemble. D'habitude, il n'y a qu'un élaïoplaste par cellule.

Nous avons pu suivre pas à pas la marche du même processus, sur le vivant, dans les cellules des hypocotyles étiolés, dans lesquelles l'évolution des élaïoplastes fut retardée.

Les images de désagrégation des élaïoplastes soit spontanée, soit provoquée par l'action de l'acide performique, confirment nos opinions sur le mode de développement des élaïoplastes.

6. Les granulations osmiophiles des élaïoplastes ressemblent aux sphérosomes de Perner en raison de certains caractères, et notamment: 1) les mêmes propriétés optiques; 2) la petite taille — elles sont de 0,3—0,5 μ de diamètre —lorsqu'elles sont gonflées, elles atteignent 0,8 μ; 3) le déplacement rapide le long de travées cytoplasmiques; 4) la tendance à se réunir en chaînettes courtes, composées de 2 (le plus souvent) à 6 grains; 5) leur nature chimique double, c'est-à-dire la présence des substances protéiques à côté des lipides.

Les différences entre les sphérosomes et les granulations osmiophiles des élaïoplastes de *A. rosea* sont les suivantes: les granulations des élaïoplastes sont plus osmiophiles, moins stables. Elles se gonflent dans l'eau, dans les sphérules qui en résultent la séparation des phases („Entmischung)" peut se produire. Elles ont la faculté de fusionner entre elles sous l'action de divers réactifs.

7. Nos études nous conduisent à admettre que les granules osmiophiles des mauves sont des sphérosomes plus riches en lipides ce qui expliquerait leur comportement différent. L'abondance de corps gras dans la cellule des mauves semble créer des conditions favorables pour l'accumulation des lipides dans les sphérosomes.

On a également signalé une certaine analogie des grains osmiophiles des elaïoplastes avec des granulations lipoïdiques décrites dans les cellules animales.

LITERATURA

Baker J. R., 1957, Lipoids globules in cells, Nature 180: 947—949.

Baker J. R., 1958, Principles of Biological Microtechnique. London, N. Y.

Barrollier I. i Suchowsky G., 1958, Betrachtungen über Lipoid-Farbstoffe. Eine neue Methode einer Sudanfärbung, Acta Histochem. 5: 294—296.

Beer R., 1909, On elajoplasts, Ann. of Bot. 23 (89).

Cain A. J., 1950, The histochemistry of lipoids in animals, Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 25 (1).

Caruso C., 1938; Si talum caratteri fisici e microchimici degli eleosomi di *Haemanthus coccineus* L., Protopl. 31: 593—602.

Faull A. F., 1935, Elaioplasts in Iris, J. Arnold Arbor. 16: 225—267.

Frey Wyssling A., 1916, Myelinartige Verquellung der Chloroplasten in Rohrzuckerlösung, Protopl. 46: 194—197.

Guilliermond A., 1921, Sur les microsomes et les formations lipoïdes de la cellule végétale, C. R. Ac. Sc. 172.

Guilliermond A., 1922, Sur l'origine et la signification des oléoplastes, C. R. Soc. Biol. 86: 437—440.

Gomori G. M. D., 1953, Microscopic histochemistry, Univers. Chicago Press.

Höfler K. i Url W., 1958, Das Verhalten der Chondriosomen bei Kappenplasmolyse, Protopl. 49: 307—319.

Kwiatkowska M., 1959, Występowanie elajoplastów w skórce rodzaju *Gentiana*, Zesz. Nauk. Uniw. Łódzkiego, Ser. II 69—87.

Lundström A. N., 1888, Über farblose Oelplastiden u die biologische Bedeutung der Oeltropfen gewisser Potamogeton Arten, Bot. Centralbl. 35: 177—181.

Luxenburgowa A., 1927, Badania cytochemiczne nad pyłkiem u Malwowatych, Ser. A/B. Rozpr. Wydz. Mat. Przyr. P. A. Um. 67: 85—151.

Luxenburgowa A., 1927, Recherches cytologiques sur les grains de pollen chez les Malvacées, Bull. 1, Ac. Pol. Sci. et des Lettres Sér. B: 363—395.

Mazia D., Brewer P. A., Alfert H., The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue, Biol. Bull. 194: 57—67.

Molisch H., 1923, Mikrochemie der Pflanze, Jena.

Nath V., Gupta B. L., Aggarswala D. K., 1959, Histochemical a morphological studies of the lipids in oogenesis, La cellule 60: 81—101.

Pearse A. C., 1957, Histochemia teoretyczna i stosowana, P.Z.W.L. Warszawa.

Perner E. S., 1952, Zellphysiologische u. zytologische Untersuchungen über den Nachweis u. die Lokalisation der Cytochrom-Oxydase in Allium-Epidermiszellen, Biol. Zbl. 71: 43.

Perner E. S., 1953, Die Sphärosomen (Mikrosomen) pflanzlicher Zellen, Protoplasma 42: 32.

Perner E. S., 1958, Die Sphärosomen der Pflanzenzelle, Protoplasmatol. Bd. III: 1—7.

Politis I., 1911, Sugli Elajoplasti nelle Mono-e Dicotyledoni, Att. Ac. Lincei 20: 599—603.

Raciborski M., 1895, Elajoplasty Liliowatych, Rozpr. Ak. Um. Krak. Seria II, 7: 1—22.

Revel I. P., S. Ito a D. W. Fawcett, 1958, Electron micrographs of myelin figures of phosfolipide simulating intracellular membranes, J. Biophys. a Bioch. Cytol. 4: 595—496.

Shenstone T. S. a. Vickery J. R., 1957, A biologically active fatty acid in *Malvaceae*, Nature 177: 94.

Sorokin H. P., 1955, Mitochondria a spherosomes in the living epidermal cell, Amer. J. Bot. 42: 225—231.

Sorokin H. P., i Sorokin S., 1956, Staining of mitochondria with neotetrazolium chloride, Am. J. Bot. 43: 183.

Steffen K., 1953, Zytologische Untersuchungen an Pollenkorn u. — schlauch I. Phasenkontrastoptische Lebenduntersuchungen an Pollenschläuchen von Galanthus nivalis, Flora 140: 140—174.

Thaler I., 1956, Studien an plastidenähnlichen Gebilden (Elaioplasten u. Sterinoplasten), Protopl. 46: 743—754.

Wałek-Czernecka A. i Kwiatkowska M., 1960, X-Ciała u *Althaea rosea* (L.) Cav., Acta Soc. Bot. Pol. 29: 483—494.

Wakker I. H., 1888, Studien über die Inhaltskörper der Pflanzenzelle, Jahrb. f. wiss. Bot. 19: 423—496.

Weber F., 1933, Myelinfiguren u. Sphärolithe aus Spirogyra Chloroplasten, Protoplasma 19: 455—462.

Wober F., 1955, „Elaioplasten" fehlen den Schliesszellen v. Hosta plantaginea, Protoplasma 44: 460—463.

Worley Z. G. a. Worley A. K., 1943, Studies of the supravitally stained Golgi apparatus, J. of Morph. 73: 365—390.

Wóycicki Z., 1929, Sur les cristalloïdes des noyaux et les „oléoplastes" chez Ornithogalum caudatum. Bull. intern. de l'Acad. Pol. Sci. et Lettres 25: 27—39.

Objaśnienia do tablic

Tablica I

Elajoplasty w skórce różnych organów u *Althaea rosea* (L.) Cav.

Fig. 1, 4, 5 — Elajoplasty ziarniste w hypokotylu. Fig. 4 — elajoplast z wakuolą w środku

Fig. 2, 3, 17 — Ziarniste elajoplasty w kieliszku; na fig. 2 widoczny jest rąbek wokół elajoplastu; na fig. 17 ziarnisty elajoplast przylega jednostronnie do jądra otoczonego chloroplastami

Fig. 6, 7, 8, 13 — Różne stadia wydobywania się kul pęcherzykowatych (formy myelinowe) z podłoża ziarnistego elajoplastu. Fig. 6 — hypokotyl, fig. 7 — wewnętrzne płatki pełnego kwiatu, fig. 8, 13 — kieliszek

Fig. 9 — Kieliszek. Elajoplast w postaci grona, częściowo rozpadający się

Fig. 10 — Elajoplasty w zalążni. W sąsiadujących ze sobą komórkach elajoplast ziarnisty i groniasty.

Fig. 11, 12 — Kielich. Elajoplast jest luźnym skupieniem kul, pozostały liczne ziarenka

Fig. 14, 15 — Elajoplasty w płatkach. Na fig. 14 widoczne jeszcze nie zmienione ziarenka. Fig. 15, pojedyncze kule odłączają się od elajoplastu

Fig. 16 — Elajoplast w skórce kielicha, utrwalonej metodą McManusa, barwionej Sudanem czarnym B

Fig. 18 — Elajoplast w kielichu. W komórkach widoczne X-ciała. Fig. 1—8 pow. ± ± 1310 ×, fig. 9—18 ± 960 ×

Table I

Élaïoplastes dans l'épiderme des différents organes d'*Althaea rosea* (L.) Cav.

Fig. 1, 4, 5 — Élaïoplastes granuleux dans l'hypocotyle.

Fig. 4 — Élaïoplastes avec une vacuole centrale.

Fig. 2, 3, 17 — Élaïoplastes granuleux dans le calicule; fig. 2, on voit par endroits une gaine qui entoure l'élaïoplaste; fig. 17 — l'élaïoplaste granuleux est accolé au noyau qui est entouré des chloroplastes.

Fig. 6, 7, 8, 13 — Divers stades de formation des boules vésiculaires (formes myeliniques) à partir du substratum de l'élaïoplaste à structure granuleuse. Fig. 6 — hypocotyle, fig. 7 — pétales internes d'une fleur double, fig. 8, 13 — calicule.

Fig. 9 — Calicule. Élaïoplaste en forme de grappe en train de se disloquer.

Fig. 10 — Élaïoplaste dans l'ovaire. Dans deux cellules voisines, on voit un élaïoplaste granuleux, un'autre — muriforme.

Fig. 11, 12 — Calicule. L'élaïoplaste présente un lâche agrégat de boules, quelques grains sont conservés.

Fig. 14, 15 — Élaïoplastes dans les pétales. Fig. 14 — on voit des granulations au sein de l'élaïoplaste non changé. Fig. 15 — les boules isolées se séparent de l'élaïoplaste.

Fig. 16 — Élaïoplaste dans l'épiderme du calice (fix. méthode de McManus, coloration au Soudan noir B).

Fig. 18. — Élaïoplaste dans le calicule; dans les cellules on voit les X-corps.

Observations sur le vivant sauf fig. 16. Fig. 1—8 grossissm. env. 1310 ×, fig. 9—18 — env. 960 ×

Table I

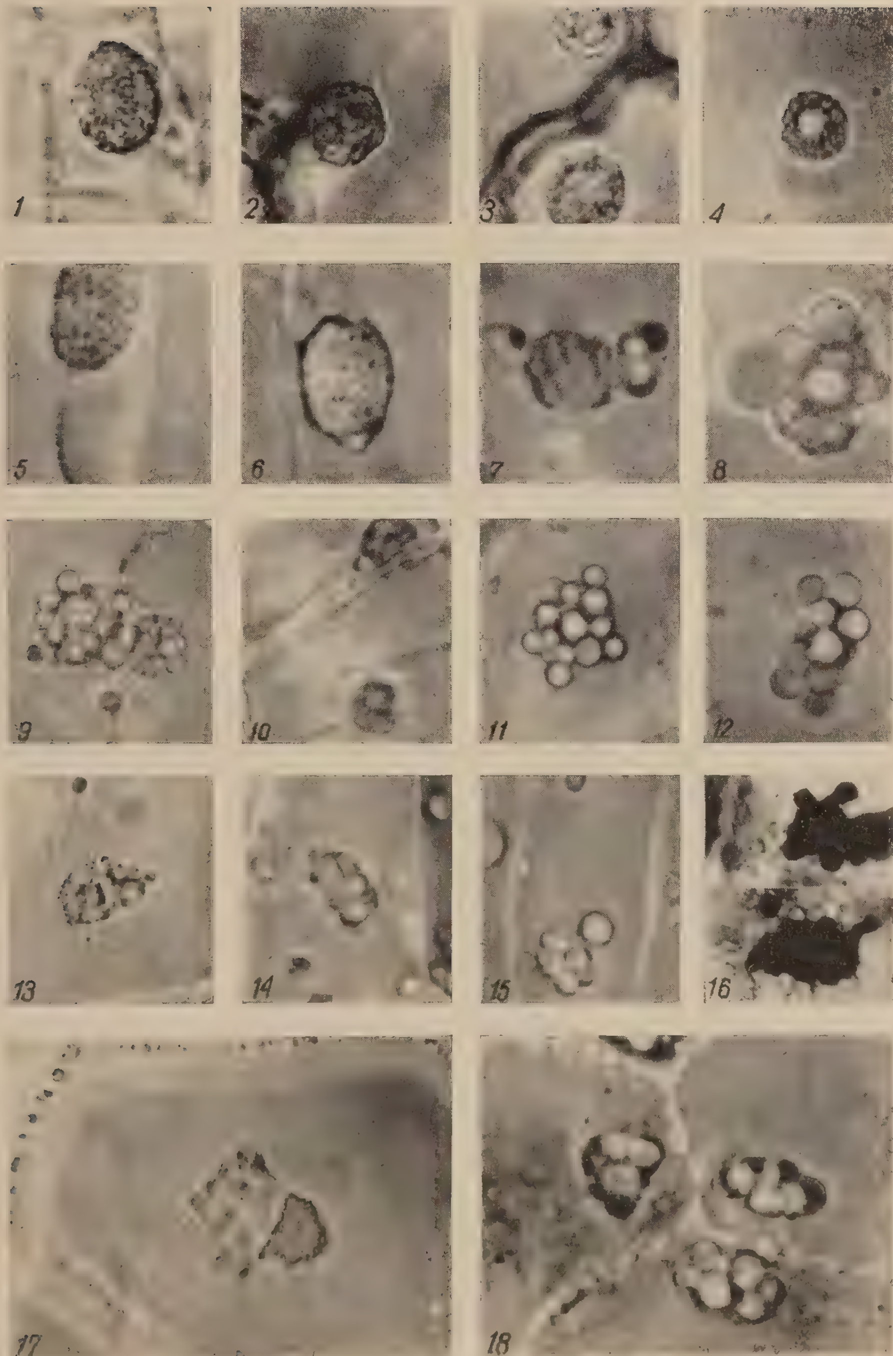
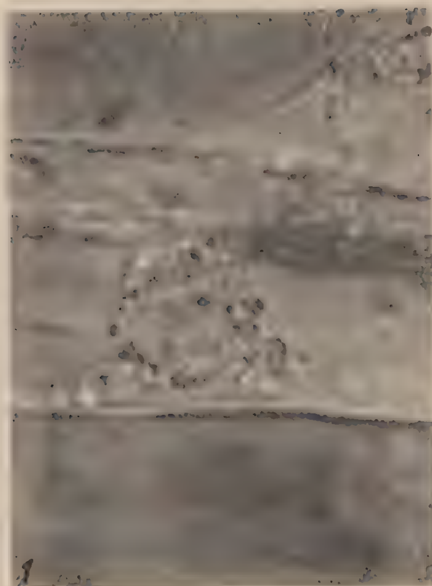
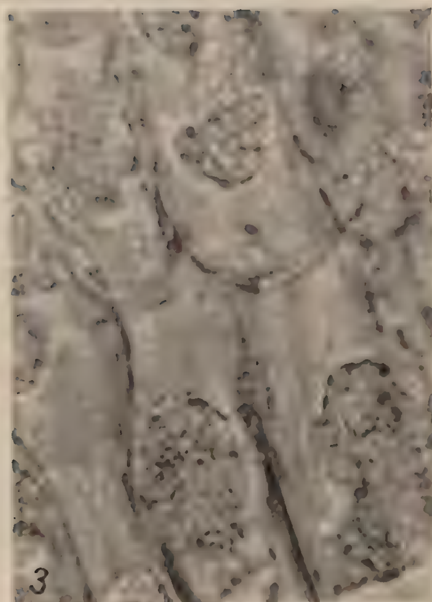
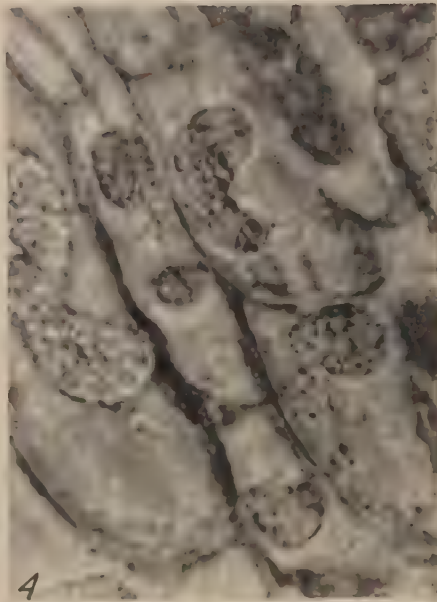


Table II









Tablica II

Elajoplasty w korzeniu i na pograniczu korzenia i hypokotylu

Fig. 1, 2 — Elajoplasty w strefie przejściowej pomiędzy korzeniem i hypokotylem. Fig. 1 elajoplasty tworzą okap miseczkowaty nad jądrem. Mniejsze skupienia ziarenek osmofilnych i plastydy ze skrobią otaczają jądro. Fig. 2. Do jądra przylega wielki elajoplast w kształcie podkowy, kontur jeszcze nie zaznaczony równą linią. Mniejsze grupy ziarniste przy jądrze jeszcze nie zlane z elajoplastem

Fig. 3, 4 — Korzeń. Płaskie elajoplasty nieregularnych kształtów, niektóre już odsunięte od jądra. Część w trakcie przechodzenia w formę kulistą.
Pow. ± 1500 ×

Table II

Élaïoplastes dans la racine et à la limite de la racine et de l'hypocotyle

Fig. 1, 2 — Élaïoplastes dans la zone intermédiaire entre la racine et l'hypocotyle Fig. 1 — élaïoplaste en forme de calotte adhère au noyau. Les amas plus petits de granulations osmiophiles et les plastides avec des grains d'amidon entourent le noyau. Fig. 2 — un grand élaïoplaste en forme de fer à cheval est accolé au bord du noyau, son contour est encore mal dessiné. D'autres groupes, plus petits, formés de granules, adhérent au noyau.

Fig. 3, 4 — Racine. Les élaïoplastes plats, de forme irrégulière, quelques uns se sont déjà éloignés du noyau, les autres sont en train de se transformer en corps sphériques.

Grossissm. env. 1500 ×

Tablica III

Powstawanie elajoplastów typu gron przez pęcznienie ziarenek osmofilnych

Fig. 1 — *Malva neglecta*. Wczesne stadium pęcznienia ziarenek. Drobne kuleczki w części środkowej elajoplastu, większe pęcherzyki z oznakami częściowego odmieszania

Fig. 2, 3, 4, 5 — *Althaea rosea*. Dalsze stadia, różne obrazy odmieszania się, na fig. 4 w części środkowej elajoplastu pozostałości ziarenek w 1, 2, a nawet 3 punktach pęcherzyków. Nieliczne ziarenka są nie zmienione

Fig. 6 — *Malva neglecta*. Formy kuliste elajoplastów przypominające owoce maliny

Fig. 7, 8 — *Althaea rosea*. Szparki w skórce kielicha. Zaczątki elajoplastów w postaci pęcherzyków z nielicznymi ziarenkami osmofilnymi

Fig. 9 — *A. rosea*. Obok elajoplastów drobne skupienia pęcherzykowate utworzone z kilku ziarenek

Fig. 10 — Elajoplast w kielichu (Nawaszin, kwaśna fuksyna)

Pow. ± 1310 ×

Table III

Transformation des élaïoplastes à structure granulaire en élaïoplastes du type grappu

Fig. 1 — *Malva neglecta*. Une phase précoce du gonflement des grains. Petites sphérules dans la partie médiane de l'élaïoplaste, les vésicules plus grandes montrent une „Entmischung" partielle.

Fig. 2, 3, 4, 5 — *Althaea rosea*. Phases suivantes, diverses images d'„Entmischung". Fig. 4 — dans la partie médiane de l'élaïoplaste, on voit quelques débris des grains adhérant aux parois des vésicules. Les grains, peu nombreux, à l'état non changé.

Fig. 6 — *Malva neglecta*. Les formes globuleuses des élaïoplastes ressemblant aux fruits des framboises.

Fig. 7, 8 — *Althaea rosea*. Les stomates dans l'épiderme du calice. Les ébauches des élaïoplastes, représentés par des corps vésiculaires, renferment un petit nombre de grains osmiophiles.

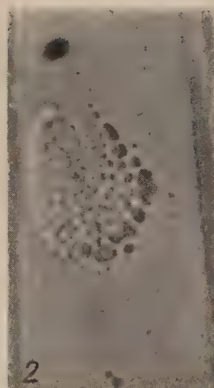
Fig. 9 — *A. rosea*. A côté des élaïoplastes des petits groupes formés de quelques grains.

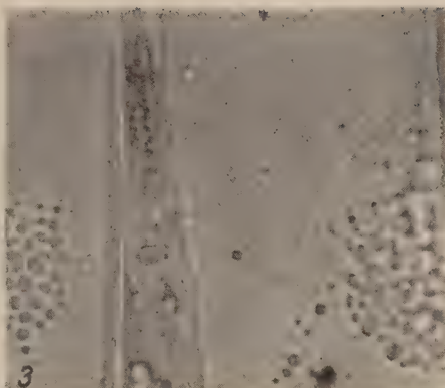
Fig. 10 — L'élaïoplaste dans le calice (liquide de Nawashine, fuchsine acide).

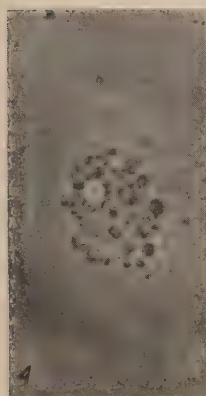
Grossissm. env. 1310 ×

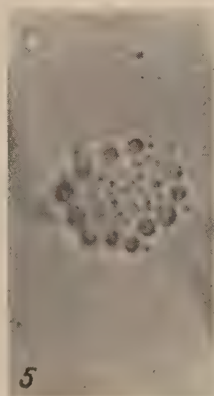
Table III

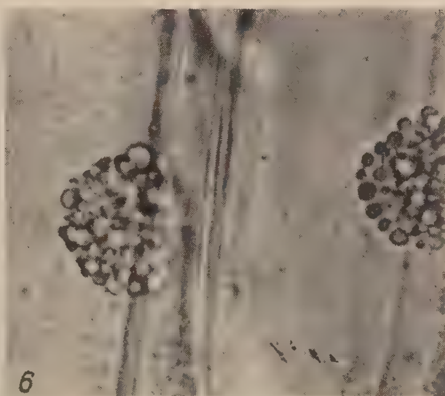


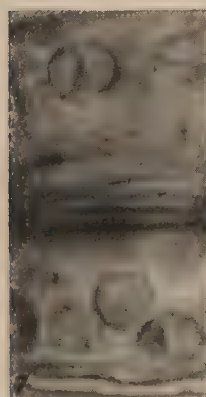




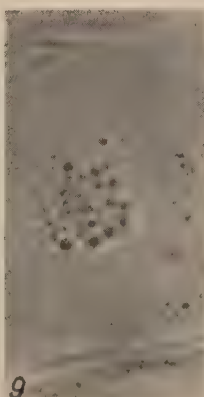












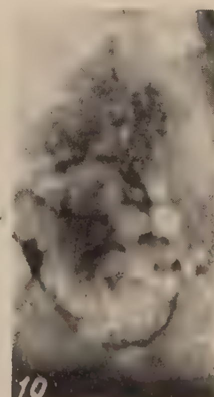
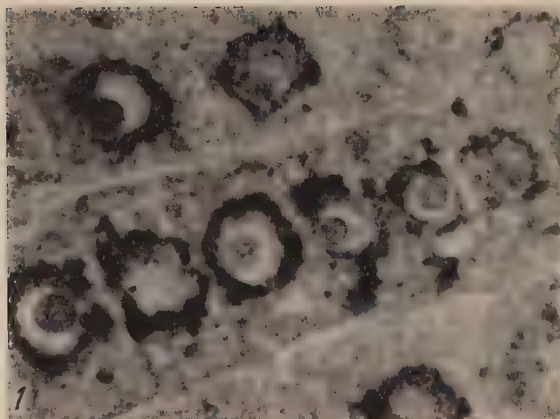
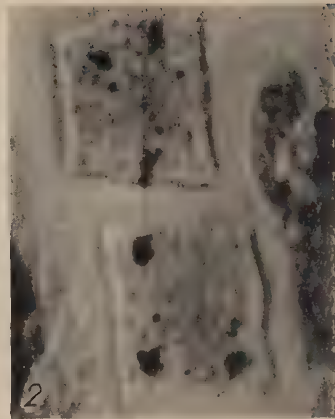
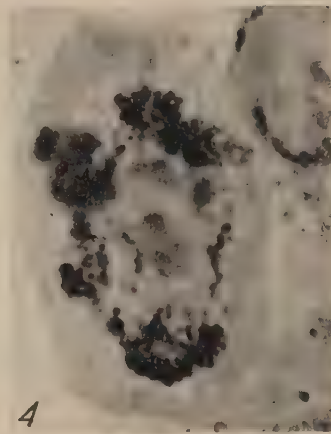


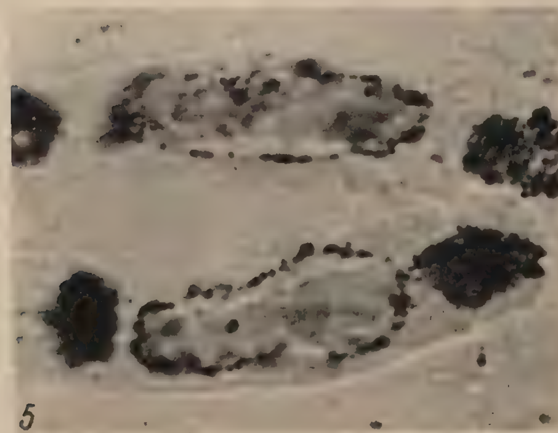
Table IV













Tablica IV

Powstawanie elajoplastów w merystemie korzeniowym

Fig. 1 — *A. rosea*. Skrawek parafinowy z wierzchołka korzenia utrwalonego płynem Mevesa. Komórki pleromu. Skupienia ziarenek i pojedyncze ziarenka otaczają jądra.

Fig. 2 — *M. neglecta*. Wierzchołek korzenia utrwalony w parach osmu umieszczony w kropli gliceryny po potraktowaniu 5 min HCl 1n. W komórkach merystematycznych nieliczne, drobne grupy ziarenek osmofilnych

Fig. 3 i 4 — To samo. Komórki pleromu. Obrazy kolejnego skupiania się ziarenek osmofilnych w okolicy jądra. Widoczne pojedyncze ziarenka w małych grupkach obok większych, ale jeszcze nieforemnych agregatów

Fig. 5 i 6 — To samo. Komórki czapeczki (fig. 5) i skórki (fig. 6)

Pow. fig. 1 ± 1500 ×, pozostałe ± 2000 ×

Table IV

Formation des élaïoplastes dans le méristème de la racine

Fig. 1 — *A. rosea*. Petits groupes de grains osmiophiles et les grains isolés autour du noyau (méthode de Meves).

Fig. 2 — *M. neglecta*. Dans les cellules méristématiques de petits amas, peu nombreux. de grains osmiophiles. (Vapeur d'OsO_4, traitement 5 min. par 1 n HCl).

Fig. 3. 4 — Le même. Cellules du plèrome. Stades successifs d'agrégation de granulations osmiophiles, au voisinage du noyau. On voit les grains isolés ou réunis en petits groupes, à côté des agrégats plus grands, mais encore difformes.

Fig. 5, 6 — Le même. Les cellules de la coiffe et de l'épiderme (fig. 6).

Grossissm.: fig. 1 — env. 1500 ×, les autres — env. 2000 ×

Tablica V

Rozpadanie się elajoplastów w żywych komórkach skórki

Fig. 1, 2 — *M. neglecta.* Kolejne stadia fragmentacji elajoplastu. Na fig. 2 oderwana część elajoplastu jest w stadium zaokrąglania się

Fig. 3, 4 — *Althaea rosea* i *M. neglecta.* Rozpadanie się elajoplastów

Fig. 5, 6 — *M. neglecta.* Ziarenka osmofilne i kuleczki tłuszczu pochodzące z rozpadania się elajoplastów.

Pow. ± 1500 ×

Table V

Désagrégation des élaïoplastes dans les cellules vivantes de l'épiderme des hypocotyles

Fig. 1, 2 — *M. neglecta.* Phases succesives de la fragmentation de l'élaïoplaste.

Fig. 2 — un fragment, détaché de l'élaïoplaste, est en train de s'arrondir.

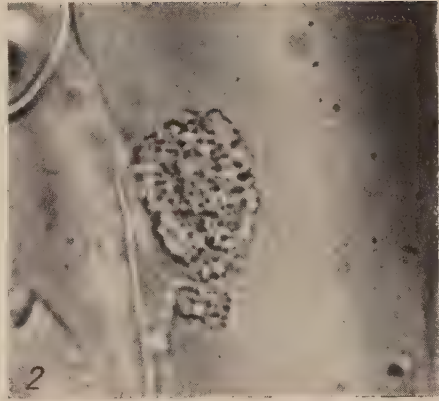
Fig. 3, 4 — *Althaea rosea* et *M. neglecta.* La désagrégation des élaïoplastes.

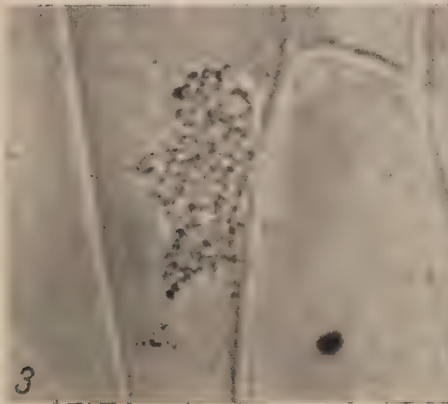
Fig. 5, 6 — *M. neglecta.* Les grains osmiophiles et les globules graisseux qui résultent de la désagrégation des élaïoplastes sous l'action de l'acide performique.

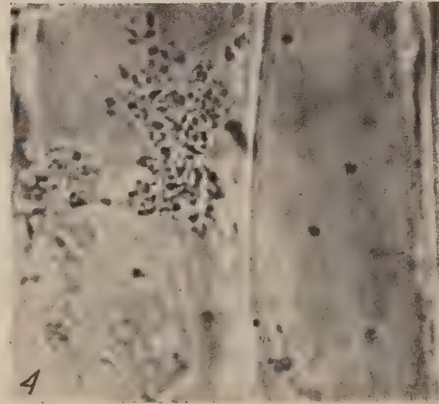
Grossissm. env. 1500 ×

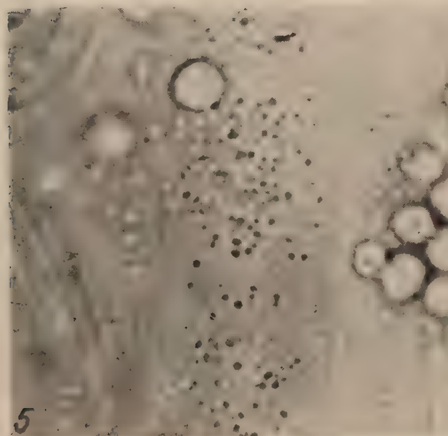
Table V

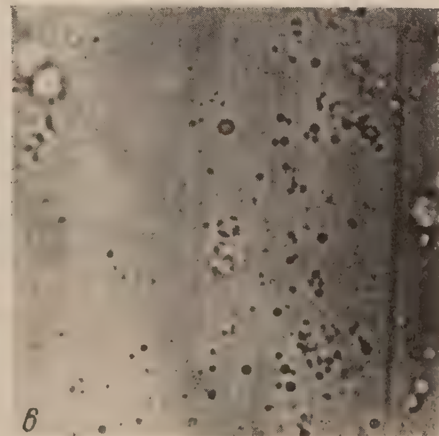












ACTA SOCIETATIS
BOTANICORUM POLONIAE
Vol. XXX — Nr 2
1961

Elajoplasty goryczek

Cz. II. Obserwacje na materiale utrwalonym

Élaïoplastes dans le genre Gentiana

P. II. Observations sur le matériel fixé

M. KWIATKOWSKA

Do listy roślin zawierających elajoplasty dołączono ostatnio rodzaj *Gentiana* (Kwiatkowska 1959). Na podstawie obserwacji na materiale żywym stwierdzono obecność elajoplastów w skórce różnych organów u 11 gatunków należących do podrodzaju *Eugentiana*, a mianowicie: *G. punctata* L., *G. frigida* Haenk., *G. asclepidea* L., *G. pneumonanthe* L., *G. verna* L., *G. Claussi* Perr. et Song., *G. cruciata* L., *G. tibetica* King., *G. Fetissowi* Rgl. et Winkl., *G. dahurica* Fisch., *G. Olgae* Rgl. et Schmhl. oraz *G. praecox* A et. et J. Kern z podrodzaju *Gentianella* (u należącej do tego samego podrodzaju *G. ciliata* L. elajoplastów nie znaleziono).

Wyniki obserwacji wskazują, że obecność elajoplastów w określonych organach uważać można za stałą cechę danego gatunku. Lokalizacja elajoplastów u gatunków należących do tej samej sekcji jest podobna.

Jak się okazało, największe i najbardziej liczne elajoplasty występują w młodych organach, w starszych zaś poza nielicznymi wyjątkami zanikają. Można więc przypuszczać, że tłuszcze zawarte w elajoplastach są przez roślinę zużywane.

Obserwowane przyżyciowo elajoplasty u dwunastu gatunków rodziny *Gentiana* L. pod względem morfologicznym były do siebie bardzo zbliżone. Są to brudnożółte, przeważnie sferyczne ciała najczęściej pokryte licznymi kulami tłuszczu, które nadają im postać groniastą. Wielkość elajoplastów w obrębie gatunku jest różna (średnica od 3 do 30 μ) zależnie od organu, wieku organu i położenia w nim elajoplastu. Różnice w wyglądzie elajoplastów obserwowanych w liściach, łodydze i kwiatach badanych

gatunków goryczek są raczej ilościowe: ograniczają się do różnicy w wymiarach oraz do ilości i wielkości wyciekających kul tłuszczu. Niejednakowy może być także okres występowania elajoplastów w poszczególnych organach.

Reakcje mikrochemiczne na materiale świeżym (Kwiatkowska 1959) i utrwalonym wskazują, że elajoplasty występujące w skórce zbadanych goryczek nie różnią się między sobą również składem chemicznym. Wobec tego obserwacje przeprowadzone na materiale utrwalonym, które stanowią przedmiot niniejszej pracy, będą omówione łącznie dla wszystkich gatunków.

MATERIAŁ I METODY

Materiał użyty do badań został zebrany głównie na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego i Tatrzańskiej Stacji Naukowej ZOP PAN w Zakopanem. Korzystano również z okazów goryczek rosnących w Ogrodach Botanicznych w Łodzi.

Skórkę zdjętą z liści, łodyg i kwiatów goryczek, u których stwierdzono poprzednio obecność elajoplastów, utrwalono następującymi metodami: Regaud, Helly'ego, Nawaszina-modyfikacja CrAF, Mevesa, Bakera, Mc Manusa. Posługiwano się również kwasem osmowym 1% (utrwalano w parach) i formaliną zbuforowaną.

Barwiono preparaty barwnikami na tłuszcze: błękitem Nilu 1% (wg Lisona 1953), Sudanem czarnym B oraz Sudanami III i IV w alkoholu 70%. Zastosowano szereg metod cytochemicznych (wg Pearsea 1957): reakcję z odczynnikiem Schiffa i kwasem nadmrówkowym — na lipidy nienasycone, reakcję plazmalową na acetalfosfatydy; wolne kwasy tłuszczowe wykrywano przy pomocy metody Fischlera, hemateinowy test Bakera stosowano dla stwierdzenia obecności fosfolipidów, metodę Schultza, kwas trójchlorooctowy i wodzian chloralu celem wykrycia steroli (Manuel 1939, Cain 1950).

Rozpuszczano tłuszcze alkoholem, acetonem, chloroformem, kwasem octowym lodowatym, a także pirydyną po utrwalaczu Bouina wg metody Bakera.

Preparaty utrwalone barwiono hematoksyliną żelazową Heidenhaina wg Buvat, kwaśną fuksyną wg Altmanna oraz rozaniliną, błękitem Wiktoria i pironiną wg Pernera (1953).

Preparaty trwałe zamykano bądź w glicerynie z żelatyną, bądź w balsamie kanadyjskim zależnie od sposobu barwienia.

Obserwacji dokonywano przy pomocy mikroskopu Zeissa i Lumipanu Zeissa. Mikrofotografie wykonano w aparacie „Mikrofot" firmy Rathenow.

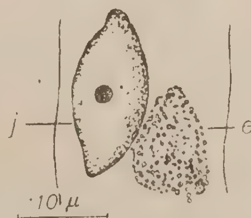
OBSERWACJE

Tłuszcze występujące w skórce organów nadziemnych goryczek ulegają rozpuszczeniu po działaniu alkoholu, acetonu, chloroformu. Elajoplasty stają się wtedy znacznie mniejsze i, jak stwierdzono poprzednio (Kwiatkowska 1959), dają dodatnią reakcję na białka. Rozpuszczalniki powyższe nie usuwają jednak całkowicie tłuszczów zawartych w elajoplastach. Nawet po roku przechowywania preparatów w alkoholu absolutnym elajoplasty barwią się barwnikami na tłuszcze.

Dłuższe przechowywanie skrawków w kwasie octowym lodowatym powoduje również częściowe rozpuszczenie tłuszczów.

Zupełną ekstrakcję tłuszczów z elajoplastów uzyskano jedynie działając pirydyną na skrawki utrwalone w płynie Bouina (wg metody Bakera). Z elajoplastu pozostaje wtedy ziarniste podłoże (ryc. 1).

Utrwalacze cytologiczne (Regaud, Meves, Helly, Nawaszin) w znacznym stopniu zachowują tłuszcze, jednak w trakcie barwienia, odwadniania alkoholem i prześwietlania preparatów ksylenem następuje stopniowe wymywanie tłuszczów. To sprawia, że w preparatach trwałych, zamykanych w balsamie po barwieniu fuksyną lub hematoksyliną, widoczne są najczęściej elajoplasty gąbczaste lub też w postaci siateczki, w której tkwią ziarenka (ryc. 2b, 3 i tabl. I, fig. 1, 2). Niezmiernie rzadko spotyka się elajoplasty, które zachowały pierwotną postać (ryc. 2a). Po zabarwieniu fuksyną można wyróżnić wtedy intensywnie czerwone, ziarniste wnętrze elajoplastu i pozostałe po wyciekających kulach wyraźnie zabarwione otoczki. Wnętrze kul jest bezbarwne.



Ryc. 1. Elajoplasty w skórce korony *Gentiana asclepiadea* L., po ekstrakcji pirydyną: *e* — elajoplast; *j* — jądro

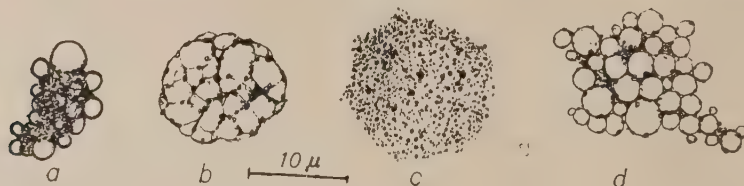
Fig. 1. Les élaïoplastes dans l'épiderme de la corolle de *Gentiana asclepiadea* L. après l'extraction à la pyridine; *e* — élaïoplaste; *j* — noyau

Zdarza się także, że elajoplasty pozostają jako całkowicie ziarniste ciała (ryc. 2c). Obrazy te wiązać można z ziarnistą postacią elajoplastów nie pokrytych kulami tłuszczu. Siateczka zaś, którą tak często obserwuje się w utrwalonych elajoplastach, jest prawdopodobnie utworzona przez częściowo zniszczone i zlepione otoczki kul tłuszczu wyciekających z elajoplastów. Przypuszczenie to potwierdzają preparaty utrwalone metodą

Mevesa i barwione hematoksyliną, w których widać niekiedy wyraźnie zaznaczone otoczki kul zamiast siateczki (ryc. 2d).

Ilość ziarenek zabarwionych fuksyną lub hematoksyliną jest mniejsza od ilości ziarenek widocznych w elajoplastach nie utrwalonych.

Intensywność zabarwienia i wielkość tych ziarenek jest różna. Wydaje się, że można wyróżnić pośród nich 2 typy: 1) nieliczne, mocniej zabarwione — prawie czarne po hematoksylinie i ciemnoczerwone po



Ryc. 2. Elajoplasty: *a* — z liścia *Gentiana Olgae* Rgl. et Schmhl. (Regaud, fuksyna); *b* — z komórki skórki liścia *G. tibetica* King., utrwalonej mieszaniną Nawaszina, barwionej hematoksyliną; *c* — z korony *G. asclepiadea* L. (Regaud, fuksyna); *d* — z korony *G. pneumonanthe* L. (utrwalacz Mevesa, barwienie hematoksyliną)

Fig. 2. *a* — élaïoplaste de la feuille de *Gentiana Olgae* Rgl. et Schmhl. (fix. Regaud, color. fuchsine); *b* — élaïoplaste de la cellule de l'épiderme de la feuille de *G. tibetica* King, fixée par le liquide de Navachine et colorée par l'hématoxyline; *c* — élaïoplaste de la corolle de *G. ascepiadea L.* (fix. Regaud, color. fuchsine); *d* — élaïoplaste de la corolle de *G. pneumonanthe* L. (fixat. Meves, color. hématoxyline)

fuksynie i 2) o wiele liczniejsze, szczególnie tam, gdzie zachowały się elajoplasty ziarniste, ziarenka zabarwione na szarogranatowo hematoksyliną i na jasnoczerwono — fuksyną.

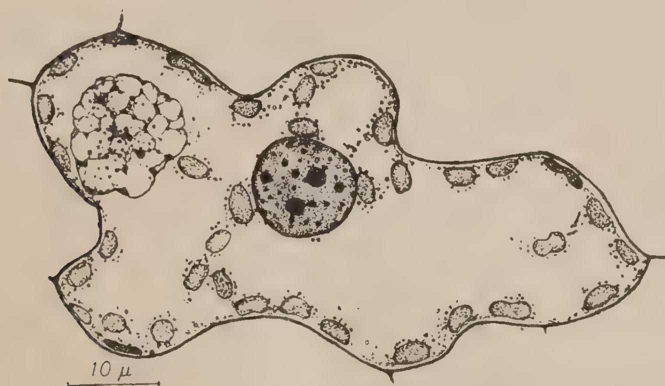
Najlepszym utrwalaczem okazał się 1% kwas osmowy (w parach). W preparatach zamykanych w żelatynie z gliceryną zachowały się niemal w zupełnie nie zmienionej postaci zarówno elajoplasty ziarniste (tab. I, fig. 3), jak i elajoplasty groniaste (tabl. I, fig. 4). Udało się je zabarwić rozaniliną, błękitem Wiktoria i pironiną wg przepisu podanego przez Pernera (1953). Elajoplasty zachowały się tutaj w postaci ziarnistych skupień (tabl. I, fig. 5). Podobnie jak po barwieniu fuksyną i hematoksyliną można w nich wyróżnić 2 typy ziarnistości, różniących się intensywnością zabarwienia, ale ilość zarówno jednych, jak i drugich jest tutaj znacznie większa.

Tłuszcze występujące w elajoplastach mają różnorodny charakter. Intensywne barwienie się kul tłuszczu błękitem nilowym na czerwono jak również barwienie Sudanem III i IV wskazuje na obecność tłuszczów obojętnych.

Wolnych kwasów tłuszczowych nie udało się wykryć miedziową metodą Fischlera.

Elajoplasty goryczek nie wyczerniają się kwasem osmowym, które to wyczernienie przypisuje się obecności wiązań nienasyconych. Nie dają też z odczynnikiem Schiffa i kwasem nadmrówkowym (kontrola — blokowanie nienasyconych wiązań Br) wiśniowego zabarwienia, które wskazywałoby na obecność nienasyconych lipidów i fosfolipidów.

Wyniki testu Bakera (kwaśna hemateina) pozwalają na stwierdzenie w elajoplastach obecności fosfolipidów, barwiących się na kolor ciemnogranatowy. Fosfolipidy skupiają się głównie w zewnętrznej warstwie kul tłuszczu i w ziarnistościach przylegających do nich. Wnętrze kul tłuszczu



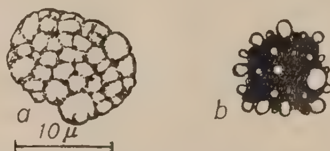
Ryc. 3. Komórka skórki z liścia *G. Olgae* Rgl. et Schmhl., po utrwaleniu płynem Nawaszina i barwieniu hematoksyliną

Fig. 3. Cellule de l'épiderme de la feuille de *Gentiana Olgae* fixée par le liquide de Navachine et colorée par l'hématoxyline

wykazuje niebieskie zabarwienie. Stąd nasuwa się przypuszczenie, że fosfolipidy występujące wewnątrz kul stanowią tylko małą domieszkę innych tłuszczów. Być może jednak zabarwienie niebieskie należy przypisać niespecyficznemu barwieniu się innych lipidów — poza fosfolipidami (Pearse).

Przy pomocy 1% błękitu nilowego, po utrwaleniu preparatu metodą McManusa, uzyskuje się również niebieskie zabarwienie niektórych ziarnistości i zewnętrznej strefy kul (ryc. 4a). Potwierdzałoby to fosfolipidowy charakter tych struktur. Zabarwienia tego nie można w tym przypadku wiązać z obecnością wolnych kwasów tłuszczowych, gdyż nie udało się ich wykryć innymi metodami (metoda Fischlera). Równocześnie wnętrze kul barwi się błękitem nilowym na czerwono. W nielicznych przypadkach uzyskano preparaty, w których błękit nilowy barwił na niebiesko cały elajoplast, wnętrze zaś wypływających kul — na czerwono (ryc. 4b).

Sudan czarny B, stosowany po utrwalaczu Regaud, Bakera, McManusa, daje czarne zabarwienie elajoplastów. Powstają przy tym bardzo różnorodne obrazy. Najczęściej cały elajoplast staje się czarny (tabl. I, fig. 6

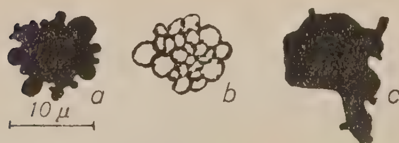


Ryc. 4. Komórka skórki z liścia *G. Olgae*. Elajoplasty wybarwione błękitem nilowym 1$^0/_0$ po utrwaleniu metodą McManusa (elementy zaznaczone na czarno były w preparacie zabarwione na kolor niebieski, bezbarwne zaś na czerwono

Fig. 4. Cellule de l'épiderme d'une feuille de *Gentiana Olgae*. Élaïoplastes colorées par le bleu de Nil 1$^0/_0$ après la fixation par la méthode de McManus. Les élements noirs sont bleus dans la préparation, les éléments incolores sont rouges

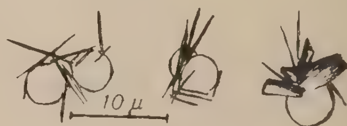
i ryc. 5a) zachowując postać grona lub też kule tłuszczu zlewają się tworząc nieforemne ciało o ostrych konturach (ryc. 5c).

Po utrwaleniu metodą McManusa, która zachowuje przede wszystkim fosfolipidy, w elajoplastach barwią się na czarno bądź ziarnistości i sia-



Ryc. 5. Różne obrazy elajoplastów barwionych Sudanem czarnym B. *a* i *c* — po utrwalaczu Bakera; *b* — po utrwaleniu metodą McManusa

Fig. 5. Divers images des élaïoplastes colorées par Soudan noir B. *a* et *c* — après le fixateur de Baker; *b* — après la fixation par la méthode de McManus



Ryc. 6. Kryształy powstające z elajoplastów w preparatach przechowywanych w kwasie octowym lodowatym

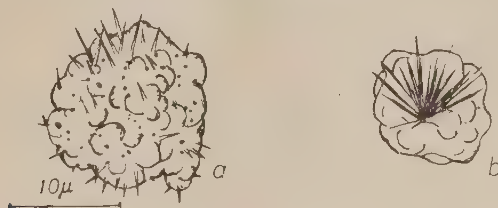
Fig. 6. Cristaux dans les élaïoplastes. Préparations consérvées dans l'acide acétique glacial

teczka, bądź otoczki kul i przyklejone do nich ziarenka. Jak wspomniano wyżej, te same struktury barwią się również innymi metodami charakterystycznymi dla fosfolipidów.

Elajoplasty goryczek nie zawierają steroli: nie dają zabarwienia z H_2SO_4 st. i bezwodnikiem kwasu octowego (metoda Schultza) ani z kwasem trójchlorooctowym (C a i n 1950) i wodzianem chloralu (M a n u e l 1939).

Reakcja na acetolfosfatydy również nie dała wyników dodatnich.

W przechowywanych przez dłuższy czas w kwasie octowym lodowatym skrawkach, w których — jak wspomniano wyżej — nastąpiło częściowe rozpuszczenie tłuszczów, zaobserwowano kryształy różnej postaci (ryc. 6). Po zabarwieniu błękitem nilowym 1%, kryształy są niebieskie, zaś nie rozpuszczone kule tłuszczu — czerwone.



Ryc. 7. Kryształy w elajoplastach. *a* — w elajoplaście utrwalonym utrwalaczem Bekera i barwionym kwaśną hemateiną; *b* — w preparacie barwionym Sudanem czarnym B

Fig. 7. Cristaux dans les élaïoplastes. *a* — dans un élaïoplaste fixé par le liquide de Baker et coloré par l'hématoxyline acide; *b* — élaïoplastes colorés par le Soudan noir B

Wytrącanie się kryształów w elajoplastach pod wpływem kwasu octowego obserwował również Riss (1918) u *Cyclanthera pedata*.

Oprócz tego rodzaju kryształów spotykano niejednokrotnie w preparatach trwałych, barwionych Sudanem IV, czarnym i kwaśną hemateiną bezbarwne, igiełkowate, dwójłomne kryształy. Tkwiły one w zabarwionych elajoplastach układając się we wszystkich kierunkach lub tworząc zgrupowania przypominające wachlarze (ryc. 7a i b).

Obecność tych kryształów stwierdzono dopiero w preparatach trwałych, dlatego nie badano ich charakteru chemicznego.

ZESTAWIENIA I WNIOSKI

Jak wykazały poprzednie obserwacje na materiale żywym, elajoplasty 12 zbadanych gatunków goryczek pod względem morfologicznym są do siebie bardzo zbliżone. Okazało się obecnie, na podstawie reakcji mikrochemicznych i barwień cytologicznych materiału utrwalonego, że nie różnią się one również składem chemicznym.

Elajoplasty goryczek zawierają tłuszcze obojętne, występujące w dużej ilości i fosfolipidy. Te ostatnie skupione są głównie w ziarnistościach elajoplastów i w zewnętrznej strefie kul, które z elajoplastów wyciekają. Wnętrze tych kul jest prawdopodobnie wypełnione mieszaniną tłuszczów obojętnych i fosfolipidów.

W odróżnieniu od innych, znanych elajoplastów, elajoplasty goryczek nie dają poczernienia ani zbrunatnienia pod wpływem kwasu osmowego. Reakcja z odczynnikiem Schiffa i kwasem nadmrówkowym również nie dała pozytywnych rezultatów. Brak więc tutaj lipidów nienasyconych.

Nie stwierdzono również obecności wolnych kwasów tłuszczowych, steroli i acetalfosfatydów.

Tłuszcze występujące w elajoplastach rozpuszczają się tylko częściowo w alkoholu abs., chloroformie, acetonie, kwasie octowym lodowatym. Po ekstrakcji tłuszczów przez te rozpuszczalniki, elajoplasty dają reakcję na białka.

Tylko pirydyna, stosowana po utrwalaczu Bouina, rozpuszcza całkowicie tłuszcze elajoplastu.

Obrazy uzyskane po utrwaleniu kwasem osmowym i barwieniu rozaniliną wskazują, że elajoplasty goryczek są skupieniami ziarnistości, które barwią się tym barwnikiem. W elajoplastach utrwalonych metodą Regaud, Mevesa i Nawaszina, barwionych hematoksyliną i fuksyną spotyka się niekiedy zachowaną strukturę ziarnistą. Jednak najczęściej w preparatach w taki sposób przygotowanych otrzymuje się elajoplasty gąbczaste lub w postaci siateczki, do której przyklejone są ziarenka.

Ziarenka elajoplastów barwionych hematoksyliną, fuksyną i rozaniliną są zróżnicowane pod względem intensywności zabarwienia i wielkości. Mocniej zabarwione ziarenka są nieco większe od pozostałych. Ponieważ dają one również reakcje na fosfolipidy, można przypuszczać, że ziarnistości te są utworzone przez kompleks lipoproteidowy albo też mają białkowy rdzeń i fosfolipidową otoczkę.

Powierzchniowa strefa kul zawiera fosfolipidy i barwi się hematoksyliną i fuksyną. Wobec tego wydaje się, że na powierzchni kul można stwierdzić również pokład o charakterze lipoproteidowym.

W preparatach przechowywanych w kwasie octowym lodowatym oraz w trwałych preparatach zamykanych w glicerynie z żelatyną obserwowano kryształy różnej postaci. Charakter ich nie został ustalony.

Z powyższego zestawienia wynika, że elajoplasty goryczek różnią się nieco składem chemicznym od opisanych elajoplastów malw (W a ł e k-C z e r n e c k a i K w i a t k o w s k a 1961), nie zawierają bowiem lipidów nienasyconych i kwasów tłuszczowych. Obrazy utrwalonych elajoplastów są bardzo zbliżone do elajoplastów malw i zdają się potwierdzać pogląd, że elajoplasty są skupieniami ziarnistości o charakterze lipoproteidów.

Pani prof. dr Annie Wałek-Czerneckiej pragnę wyrazić jak najgłębszą wdzięczność za serdeczną opiekę, cenne rady i wskazanie metod pracy.

Katedra Anatomii i Cytologii Roślin
Uniwersytetu Łódzkiego

(Wpłynęło 11.1.1961 r.)

RÉSUMÉ

Nos recherches précédentes (Kwiatkowska 1959) ont démontré que les élaïoplastes de 12 espèces du genre *Gentiana*, étudiés sur le vivant, se ressemblent au point de vue morphologique. Les réactions histochimiques et différents modes des colorations cytologiques des élaïoplastes fixés, exécutés au cours du travail présent, prouvent qu'ils possèdent aussi la même constitution chimique.

Les élaïoplastes des gentianes renferment des lipides neutres qui apparaîssent en grande quantité, et des phospholipides. Ces derniers sont disposés surtout dans les granulations des élaïoplastes et dans la zône périphérique des boules lipidiques qui s'exsudent des élaïoplastes. L'intérieur des ces boules est vraisemblablement occupé par un mélange de graisses neutres et de phospholipides.

Contrairement aux autres élaïoplastes, les élaïoplastes des gentianes ne noircissent ni ne brunissent pas par l'acide osmique. La réaction PFAS donne aussi des résultats négaitfs, ce qui montre que les élaïoplastes des gentianes sont dépourvus des lipides non-saturés. On n'a constaté non plus la présence d'acides gras libres, de stérols, ni d'acétalphosphatides.

Les lipides des élaïoplastes ne sont que partiellement solubles dans l'alcool, le chlorophorme, l'acétone, l'acide acétique glacial. Après l'extraction des lipides par ces solvants, les élaïoplastes donnent les réactions des protéines.

Ce n'est que la pyridine qui dissout entièrement les lipides, après fixation au liquide de Bouin.

Les images obtenus dans le matériel fixé par l'acide osmique montrent que les élaïoplastes des gentianes sont des agglomérations de granules qui se colorent en rouge par la rosaniline.

Dans les coupes fixées par la méthode de Regaud, de Meves et de Navachine, colorées par l'hématoxyline ferrique ou par la fuchsine acide d'Altmann, la structure granuleuse des élaïoplastes est parfois conservée. Mais le plus souvent les élaïoplastes offrent après se traitement l'aspect spongieux ou réticulé, avec des granulations accolées aux filaments du réseau.

Les granulations des élaïoplastes, observées dans des préparations fixées et colorées, diffèrent par leur taille et l'intensité de leur coloration. Ce sont les granules plus grands qui se colorent plus fortement. Comme les granules des élaïoplastes donnent en même temps la réaction positive des phospholipides et des protéines, on peut supposer qu'ils soient constitués d'un complexe lipoprotéique ou qu'ils renferment au centre des substances protéiques, leur zône périphérique étant phospholipidique.

La zône périphérique des boules lipidiques contient des phospholipides et se colore par l'hématoxyline et par la fuchsine. Elle semble donc avoir aussi le caractère lipoprotéique.

Dans les coupes conservées dans l'acide acétique glacial et dans les préparations montées à la glycérine gélatinisée, on observe des cristaux de formes variées. Leur nature n'a pas été élucidée.

Il résulte de ce résumé que les élaïoplastes des gentianes diffèrent par leur constitution chimique de ceux décrits chez les mauves (Wałek-Czernecka i Kwiatkowska 1961): ils ne contiennent pas de lipides non-saturés ni d'acides gras. Les images des élaïoplastes fixés et colorés sont très semblables aux élaïoplastes des Malvacées et paraîssent confirmer l'opinion émise précédemment (Wałek-Czernecka i Kwiatkowska, 1961) que les élaïoplastes sont des conglomérats de granules dont la nature est en même temps lipidique et protéique.

LITERATURA

Cain A. J., 1950. The histochemistry of lipoids in animals, Biol. Rev. 25. (1).

Kwiatkowska M., 1959. Występowanie elajoplastów w skórce rodzaju *Gentiana* L., Zeszyty Nauk. U.Ł.S. II, 5: 69—87.

Lison L., 1953. Histochimie et cytochimie animales. Paris.

Manuel J., 1939. Recherches sur la formation de stérides dans les chloroplastes de certaines cactées, Rev. Genér. Bot. 48: 49—80.

Pearse E., 1957. Histochemia teoretyczna i stosowana, P.Z.W.L., Warszawa.

Perner E. S., 1953. Die Sphärosomen (Mikrosomen) pflanzlicher Zellen, Protoplasma 42: 32.

Riss M. M., 1918. Die Antherenhaare von *Cyclanthera pedata* (Schrad.) und einiger anderer Cucurbitaceen, Flora N. F. 11/12: 541—559.

Wałek-Czernecka A., i M. Kwiatkowska 1961. Elajoplasty ślazowatych. W druku.

Tablica I

Fig. 1, 2 — Fragment skórki kielicha *Gentiana punctata* L. utrwalonej płynem Nawaszina barwionej hematoksyliną. Fig. 1 — pow. ok. 450 ×, fig. 2 — pow. ok. 1350 ×

Fig. 3, 4 — Elajoplasty — ziarnisty i groniasty. Skórka z liścia *G. tibelica* King. utrwalona kwasem osmowym 1%. zamykana w żelatynie z gliceryną. Pow. ok. 1350 ×

Fig. 5 — *Gentiana tibetica* King., skórka z liścia utrwalona kwasem osmowym, barwiona rozaniliną, wg Pernera. Pow. ok. 1350 ×

Fig. 6 — *Gentiana asclepiadea* L. Skórka korony utrwalona płynem Regaud barwiona Sudanem czarnym B. Pow. ok. 450 ×

Table I

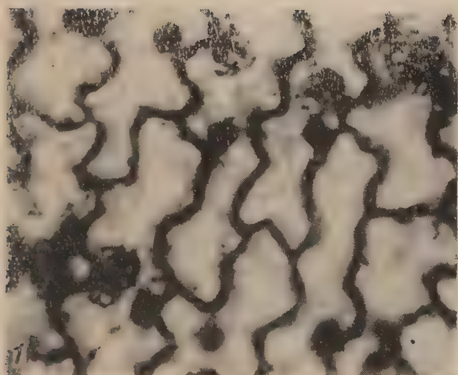
Fig. 1 et 2. Fragment de l'épiderme du calice de *Gentiana punctata* L. fixé par le liquide de Navachine, coloré par l'hématoxyline (fig. 1 gross ca 450 ×, fig. 2 gross ca 1350 ×)

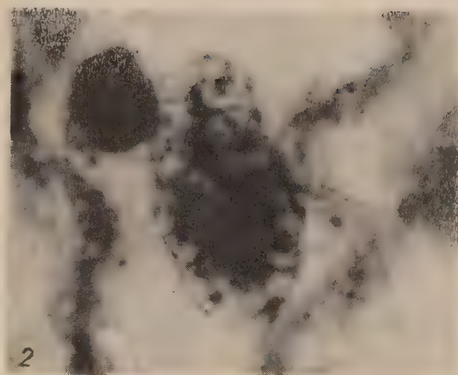
Fig. 3 et 4. Élaïoplaste granuleux et grappu. Épiderme de la feuille *Gentiana tibetica* King. fixé par l'acide osmique 1% monté à la gélatine glicérinée. (Gross ca 980 ×)

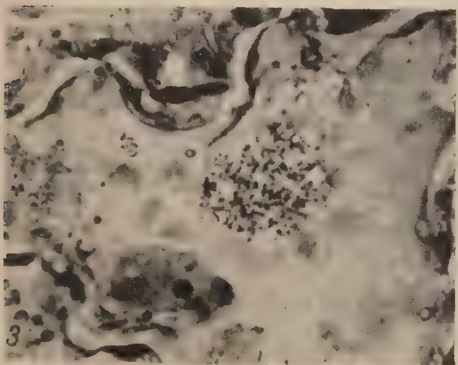
Fig. 5. *Gentiana tibetica*. Épiderme de la feuille fixé par l'acide osmique, coloré par rosaniline d'après Perner. (Gross ca 1350 ×)

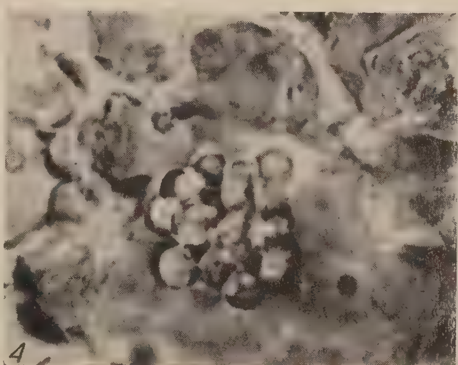
Fig. 6. *Gentiana asclepiadea* L. Épiderme de la corolle fixé par Regaud, coloré par Soudan noir B (Gross ca 450 ×)

Tablica I













ACTA SOCIETATIS
BOTANICORUM POLONIAE
Vol. XXX — Nr 2
1961

Chromatografia bibułowa kwasów organicznych w toku rozwoju bobiku (*Vicia faba* L. *minor*)

Paper chromatography of organic acids in growing horse bean (Vicia faba L. minor)

R. W. SCHRAMM, M. PIĄTKOWSKA

Rola, jaką pełnią kwasy organiczne w roślinach, przede wszystkim w toku przemian, sprawia, że badania nad nimi rozwijają się ostatnio coraz intensywniej. W szczególności dobrym materiałem okazały się rośliny strączkowe z rodziny motylkowatych (*Papilionaceae*), które w porównaniu z innymi roślinami uprawnymi wykazują wysoką zawartość kwasów organicznych zarówno w nasionach, jak i w organach wegetatywnych (Sołdatienkow, Mazurowa 1956a; Dupéron 1958). Spomiędzy nich fasola, a zwłaszcza groch, już od dawna są klasycznym materiałem w fizjologii i biochemii roślin, ostatnio zaś zaczęto przeprowadzać badania nad bobikiem.

Prace nad zawartością i przemianami kwasów organicznych u bobiku, prowadzone głównie na uniwersytecie w Leningradzie, liczą zaledwie kilka lat i tymczasem ograniczają się do najbardziej uchwytnych zmian. Czesnokow (1954) stwierdził w liściach bobiku, podobnie jak u fasoli, duże ilości kwasu cytrynowego, sięgające nawet kilkunastu procent suchej masy. Sołdatienkow i Mazurowa (1956a, b) znaleźli w nich mniejszą zawartość kwasu cytrynowego, w granicach 4—5%, co stanowi około 40% wszystkich kwasów występujących w liściach; tyle samo mniej więcej przypada na kwas jabłkowy. W suchych nasionach zawartość kwasu cytrynowego jest według tych samych autorów znacznie mniejsza i wynosi niespełna 0,5%, co i tak, podobnie jak i u innych motylkowatych, stanowi ponad 50% wszystkich kwasów; kwas jabłkowy natomiast występuje w ilości dziesięciokrotnie mniejszej, a więc niespełna 0,05%. W czasie kiełkowania nasion stosunki te ulegają dużym zmianom i kwas cytrynowy przekształca się częściowo w jabłkowy (Czesnokow i in. 1955; Sołdatienkow, Mazurowa 1956a). W orga-

nach zielonych rośliny bezwzględna ilość kwasów organicznych wzrasta w ciągu dwóch tygodni od wykiełkowania około dwukrotnie w stosunku do nasion, przy czym wzrost ten przypada wyłącznie na kwas jabłkowy, podczas gdy ilość wszystkich innych nieco maleje (Sołdatienkow, Mazurowa 1956a). Obok tych dwóch kwasów, zdecydowanie przeważających ilościowo, znaleziono w bobiku jeszcze drobne ilości kwasów lotnych, kwasu szczawiowego oraz kwasy powstałe z pierwotnego utleniania pentoz i heksoz (Sołdatienkow, Mazurowa 1956b).

W naszej pracy chcieliśmy prześledzić, przy pomocy chromatografii bibułowej, zachowanie się kwasów organicznych w toku rozwoju bobiku, zwracając uwagę, poza organami zielonymi, również na nie badany dotychczas system korzeniowy, który w metabolizmie rośliny odgrywa dużą rolę (Kursanow 1954, 1957).

Już po zakończeniu naszych zasadniczych badań ukazała się praca Coic i Lesaint (1960) na podobny temat. Autorzy ci przy pomocy chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym i anionicie Dowex 1 przeprowadzili analizę jakościową i ilościową kwasów organicznych w liściach, korzeniach i brodawkach bobiku z jednorazowego zbioru, w zależności od nawożenia potasem. Wyniki ich doświadczeń są porównane z naszymi w dyskusji.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiał i metody

Materiałem doświadczalnym był bobik (*Vicia faba* L. *minor*), odmiana nadwiślańska. Dojrzałe nasiona, o sile kiełkowania ponad 90%, moczono przez 24 godziny w wodzie destylowanej, po czym wysadzano do wazonów z ziemią kompostową o pH 7,2. Hodowlę prowadzono w warunkach średniej wilgotności na oszklonej werandzie w temperaturze wahającej się pomiędzy 18°C w nocy a 28°C w dzień.

Nasiona kiełkowały przeciętnie 3—4 dnia, licząc jako pierwszy dzień namoczenia, 5—6 dnia następowało różnicowanie pędu i korzenia, około 7 dnia wybijanie się pędu na powierzchnię gleby, po czym od 8 dnia kolejne pojawianie się liści. Pełne kwitnienie miało mejsce około 70 dnia hodowli.

Do analizy brano nasiona suche, nasiona moczone 24, 36 i 48 godzin, nasiona kiełkujące w glebie po uprzednim namoczeniu przez 24 godzin, a następnie rozwijające się rośliny drugiego, czwartego, szóstego, ósmego, jedenastego, piętnastego i dwudziestego dnia od wysadzenia, i dalej co 10 dni aż do okresu kwitnienia. W pierwszych stadiach rozwoju analizo-

wano nasiona jako całość, począwszy od szóstego dnia osobno liścienie, korzenie, łodygi i liście, które w późniejszym okresie dzielono na liście stare i młodsze oraz najmłodsze, dopiero rozwijające się, które brano do analizy razem ze stożkami wzrostu, a wreszcie kwiaty.

Kwasy ekstrahowano z tkanek roślinnych etanolem na zimno wychodząc z 5 g świeżej masy i oczyszczano na kolumnach z wymieniaczami jonowymi: kationowym i anionowym w sposób podany w pracy Schramma (1961). Odparowane do sucha wolne kwasy organiczne podejmowano 250 µl wody. Do oddzielania kwasów jednokarboksylowych od dwu- i trójkarboksylowych i ich analizy rechromatograficznej brano wyciąg z całych piętnastodniowych roślin.

Wzorce kwasów organicznych były przeważnie preparatami firm amerykańskich (Sigma Chemical Company, St. Louis; California Corporation for Biochemical Research, Los Angeles), a częściowo niemieckich (Schering-Kahlbaum, Berlin; E. Merck, Darmstadt) i szwajcarskich (Fluka). Odczynniki do analiz były pochodzenia krajowego.

Chromatografia bibułowa

Analizy przeprowadzano drogą chromatografii bibułowej używając bibuły Whatman Nr 1. Wyciągi z nasion suchych, moczonych oraz kiełkujących (do czwartego dnia włącznie) nakraplano na bibułę w ilościach 10, 14 i 18 µl; począwszy od szóstego dnia, gdy zawartość kwasów w materiale roślinnym wyraźnie wzrosła, nakraplanie zmniejszono do 6, 10 i 14 µl. W badaniach rechromatograficznych nanoszono znacznie większe ilości eluatu, którego stężenie nie było znane. Rozwinięte i wysuszone chromatogramy wywoływano 0,04% zalkalizowanym roztworem purpury bromokrezolowej w etanolu.

Stosowano normalną technikę wstępującą na zwiniętych cylindrycznie szerokich paskach bibuły (Williams, Kirby 1948; Schramm 1960) oraz technikę wstępującą paskowo-krążkową Matthiasa (1954). Do rozwijania chromatogramów z ekstraktów używano jako podstawowych rozpuszczalników własnych (Schramm 1960): kwaśnego SchA — n-butanol: octan etylu: kwas mrówkowy, 1 : 1 : 1, i alkalicznego $SchB_2$ — etanol: bufor amonowy, 3 : 1. Do rozdzielania kwasów jedno- i wielokarboksylowych (Aronoff 1956) stosowano rozpuszczalnik alkaliczny BH — n-butanol nasycony 1,5 N amoniakiem (Brown, Hall 1950; Brown 1950; Reid, Lederer 1951). Dalsze rozdzielanie plam, rozwiniętych w rozpuszczalnikach SchA, $SchB_2$ i BH, przeprowadzano, względnie sprawdzano ich jednorodność, za pomocą rechromatografii. W tym celu eluowano odpowiednie plamy (lub prążki według Matthia-

sa) wycinając je z rozwiniętych chromatogramów, tnąc na maleńkie skrawki, zalewając około 15 ml wody i gotując na małym płomieniu przez 40 minut. Eluat zagęszczony do około 0,5 ml nanoszono na bibułę i rozwijano w drugim rozpuszczalniku podstawowym oraz w kwaśnym rozpuszczalniku eterowym SM — eter etylowy: kwas mrówkowy: woda, 18 : 5 : 9, faza eterowa (Sołdatienkow, Mazurowa 1959; Schramm 1960). Kwasy jednokarboksylowe, eluowane z chromatogramów rozwiniętych w rozpuszczalniku BH, rechromatografowano równolegle we wszystkich trzech pozostałych rozpuszczalnikach.

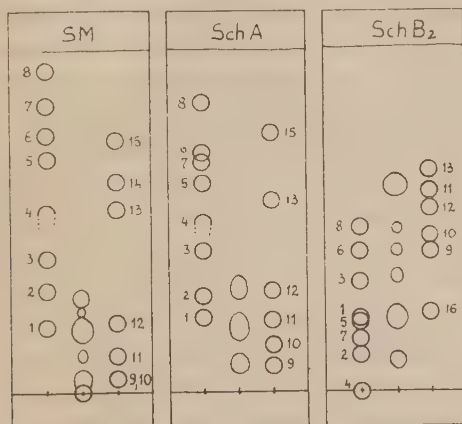
Plamy kwasów porównywano z rozwijanymi równolegle na tych samych chromatogramach plamami kwasów wzorcowych: akonitowego, bursztynowego, cytrynowego, fumarowego, jabłkowego, malonowego, szczawiowego i winowego. Przy badaniu kwasów jednokarboksylowych, eluowanych z chromatogramów rozwiniętych w rozpuszczalniku BH, stosowano ponadto jako wzorce kwasy: chinowy, gallusowy, glikolowy, glioksylowy (sól sodowa), glukonowy (δ-lakton), glukuronowy, mlekowy i szikimowy. Dodatkowo przeprowadzano identyfikację kwasów cytrynowego, jabłkowego, bursztynowego i fumarowego specyficznymi metodami chemicznymi. W tym celu wymywano odpowiednie plamy w sposób identyczny jak do rechromatografii i zagęszczony eluat uzupełniano do 5 ml. Biorąc do analizy całą objętość, identyfikowano kwas cytrynowy metodą Weil-Malherbe'a i Bone'a (1949) w modyfikacji Taylora (1953), kwas jabłkowy metodą Reifera (1955), kwas zaś bursztynowy oraz fumarowy, po uprzednim utlenieniu do kwasu bursztynowego (Krebs i in. 1940), srebrową metodą strąceniową Virtanena (1943).

Wyniki

We wszystkich fazach rozwoju bobiku i we wszystkich organach z wyjątkiem kwiatów stwierdzono obecność kwasów cytrynowego, jabłkowego, bursztynowego i fumarowego. Kwas cytrynowy występuje zdecydowanie w największych ilościach w nasionach suchych i moczonych oraz w liściach. W korzeniach przeważa kwas jabłkowy. Kwasy bursztynowy, a zwłaszcza fumarowy, występują w ilościach znacznie mniejszych, czasem nawet trudno uchwytnych chromatograficznie. Kwas szczawiowy pojawia się w ilościach wykrywalnych w pierwszych liściach, stosunkowo większe jego ilości dadzą się też stale obserwować w tkankach zielonych.

Poza tymi kwasami występuje w bobiku szereg innych, których nie udało się zidentyfikować. We wszystkich tkankach znajdują się w dużych ilościach substancje kwaśne, dające na chromatogramach silne plamy o wartości R_f zbliżonej we wszystkich trzech rozpuszczalnikach do kwasu

winowego (około 0,20). Równocześnie występuje inna plama kwaśna o wartości R_f 0,11—0,15 w rozpuszczalniku SchA i 0,55—0,63 w $SchB_2$. Rechromatografia z osobna oraz razem tych plam, eluowanych z obu rozpuszczalników, zdaje się wskazywać na to, że jest to w obu przypadkach ta sama mieszanina co najmniej dwóch kwasów o wartościach R_f wynoszących w rozpuszczalniku BH 0,16—0,19 i 0,21—0,24.



Ryc. 1. Chromatogramy kwasów organicznych jednokarboksylowych z tkanek bobiku. Kwasy eluowane z chromatogramów rozwiniętych w rozpuszczalniku BH (n-butanol nasycony 1,5 N amoniakiem), rechromatografowane w rozpuszczalnikach: SM (eter etylowy: kwas mrówkowy: woda 18 : 5 : 9, faza eterowa), SchA (n-butanol: octan etylu: kwas mrówkowy 1 : 1 : 1) i $SchB_2$ (etanol: bufor amonowy 3 : 1). Kwasy organiczne używane jako wzorce: *1* — winowy, *2* cytrynowy, *3* — jabłkowy, *4* — szczawiowy, *5* — malonowy, *6* — bursztynowy, *7* — akonitowy, *8* — fumarowy, *9* — glukuronowy, *10* — glukonowy (δ-lakton), *11* — chinowy, *12* — szikimowy, *13* — glikolowy, *14* — gallusowy, *15* — mlekowy, *16* — glioksylowy (sól sodowa).
Bibuła Whatman Nr 1, chromatografia wstępująca

Fig. 1. Chromatograms of organic monocarboxylic acids from horse bean tissues. The acids eluted from the chromatograms developed in the solvent BH (n-butanol saturated with 1,5 N ammonia), rechromatographed in solvents: SM (ethyl ether: formic acid: water 18 : 5 : 9, ether phase), SchA (n-butanol: ethyl acetate: formic acid, 1 : 1 : 1) and $SchB_2$ (ethanol: ammonia buffer, 3 : 1). The samples of acids: *1* — tartaric, *2* — citric, *3* — malic, *4* — oxalic, *5* — malonic, *6* succinic, *7* — aconitic, *8* — fumaric, *9* — glucuronic, *10* — gluconic (δ-lacton), *11* — quinic, *12* — shikimic, *13* — glycollic, *14* — gallic, *15* — lactic, *16* — glyoxylic (sodium salt).
Paper Whatman No. 1, ascending chromatography

Obok tych wyróżniających się plam kwaśnych występują na chromatogramach jeszcze inne, mniej wyraźne, często zlewające się ze sobą, na ogół o niewysokich wartościach R_f. Z reguły występuje też plama kwaśna w miejscu naniesienia ekstraktu (R_f równe 0 we wszystkich rozpuszczalnikach).

Analiza rechromatograficzna kwasów jednokarboksylowych rozwiniętych pierwotnie w rozpuszczalniku BH wykazuje, że w bobiku poza kwasami dwu- i trójkarboksylowymi, których R_f w tym rozpuszczalniku wynosi 0, występuje jeszcze co najmniej 6 innych kwasów. Porównanie ich z wzorcami ośmiu kwasów jednokarboksylowych alifatycznych i cyklicznych (ryc. 1) wskazuje na to, że mogą być między nimi kwasy chinowy, szikimowy i ewentualnie glukuronowy.

Jeśli chodzi o zawartość kwasów w poszczególnych organach i fazach rozwoju bobiku, to na podstawie porównania poszczególnych chromatogramów przedstawia się ona następująco: Ilość kwasów znajdujących się w suchych nasionach (z czego większość stanowi kwas cytrynowy) wzrasta w czasie ich moczenia. W okresie kiełkowania (od trzeciego do szóstego dnia) zaznacza się ubytek kwasów w nasieniu. W szczególności eluat kwasów jednokarboksylowych z rozpuszczalników SchA i $SchB_2$ daje w tym stadium na rechromatogramach w rozpuszczalniku BH tylko jedną plamę o wartości R_f 0,16—0,19. W dalszym ciągu w rozwoju rośliny ilość kwasów silnie wzrasta. Maksimum ich zawartości wykazują młode liście, przy czym z kwasów zidentyfikowanych pierwsze miejsce zajmuje w nich znowu kwas cytrynowy. Zawartość kwasów w starych liściach, mających już tendencję więdnięcia i obumierania, jak również w najmłodszych, dopiero rozwijających się, jest mniejsza. Jeszcze mniejsza ilość kwasów występuje w pąkach szczytowych, łodygach i korzeniach, przy czym w tych ostatnich na pierwsze miejsce wysuwa się kwas jabłkowy. W kwiatach, w wykrywalnych ilościach, stwierdzono tylko kwas cytrynowy.

DYSKUSJA WYNIKÓW

Wyniki naszych badań są w zasadzie zgodne z dotychczasowymi pracami, aczkolwiek nie wszystkie kwasy, podawane jako typowe dla roślin motylkowatych, udało się nam wykryć na chromatografach. W szczególności nie mogliśmy zidentyfikować pospolitego u motylkowatych kwasu malonowego (Bentley 1952; Sołdatienkow, Mazurowa 1957; Young, Shannon 1959), który w bobiku występuje w dosyć dużych ilościach, zwłaszcza w korzeniach roślin rosnących w warunkach deficytu potasowego (Coic, Lesaint 1960). Być może jednak, że nie pozwalały na to stosowane przez nas rozpuszczalniki. W $SchB_2$ wartość R_f kwasu malonowego jest bardzo zbliżona do kwasu winowego, a przy tym oba te kwasy może maskować występująca w tym samym miejscu silna nie zidentyfikowana plama. W SchA, podobnie jak w większości rozpuszczalników kwaśnych, wartość R_f kwasu malonowego jest nieco niższa od

kwasu bursztynowego. Nie jest wykluczone, że występująca w tym rozpuszczalniku plama. niekiedy nawet dosyć silna, a zawsze rozmyta, jak wszystkie plamy o dużych wartościach R_f którą przyjmowaliśmy za kwas bursztynowy na podstawie jej położenia i reakcji specyficznej, w rzeczywistości jest mieszaną plamą kwasów bursztynowego i malonowego. Wobec braku wzorca nie mogliśmy również zidentyfikować chromatograficznie kwasu glicerolowego, który występuje w bobiku w poważnych ilościach, szczególnie w liściach (Morrison, Dekock 1959; Coic, Lesaint 1960).

Duża zawartość kwasu jabłkowego w korzeniach, którą stwierdzili również Coic i Lesaint (1960). potwierdza wybitną rolę systemu korzeniowego w pobieraniu i wiązaniu dwutlenku węgla (Kursanow 1957; Jackson, Coleman 1959).

Identyfikacja na chromatogramach kwasów rozwijających się w rozpuszczalniku BH napotyka na duże trudności. Na podstawie położenia plam w rozpuszczalnikach SchA, $SchB_2$ i SM można przypuścić obecność kwasów chinowego, szikimowego i glukuronowego. Dwa pierwsze zostały znalezione w tkankach bobiku (Coic. Lesaint 1960). Kwas glukuronowy jest szeroko rozpowszechniony w tkankach roślinnych (Ookubo 1957) podobnie zresztą jak i inne kwasy uronowe, i to nie tylko w stanie wolnym, lecz zwłaszcza jako składnik poliuronidów (hemiceluloz). Kwasy uronowe występują razem z innymi kwasami w ekstraktach z tkanek roślinnych i pojawiają się na chromatogramach niejednokrotnie w dużych ilościach (Kursanow, Kulajewa 1957). W tkankach roślinnych w ogóle tworzą się różnego typu kwaśne produkty utleniania cukrów (Bell 1955; Sołdatienkow, Mazurowa 1956b), jednak ich identyfikacja wyłącznie na podstawie chromatografii bibułowej jest praktycznie niemożliwa. Nie jest wykluczone że do jakiegoś związku tego typu należy również plama kwaśna o R_f zbliżonym do kwasu winowego; sam kwas winowy nie był dotychczas znaleziony w bobiku.

STRESZCZENIE

Przy pomocy chromatografii bibułowej badano kwasy organiczne w oczyszczonych alkoholowych wyciągach z tkanek bobiku. Do analizy brano nasiona suche, moczone 24, 36 i 48 godzin, nasiona kiełkujące w glebie oraz liście, łodygi, korzenie i kwiaty roślin hodowanych w kulturach wazonowych w ziemi kompostowej. We wszystkich stadiach rozwoju i we wszystkich organach, z wyjątkiem kwiatów, stwierdzono obecność kwasów: cytrynowego, jabłkowego i niewielkich ilości bursztynowego oraz fumarowego; w zielonych organach znaleziono również kwas szczawiowy. Analiza rechromatograficzna kwasów jednokarboksylowych wykazała obecność w tkankach co najmniej sześciu tego typu związków między innymi kwasów

chinowego i szikimowego. W dużych ilościach występują prawdopodobnie kwasy uronowe, bliżej nie zidentyfikowane, oraz inne kwaśne produkty utleniania cukrów. Ilość kwasów znajdujących się w suchych nasionach wzrasta w czasie moczenia, następnie maleje nieco w okresie kiełkowania (3—6 dni), po czym znowu wzrasta, osiągając maksimum w liściach. W nasionach suchych, kiełkujących i w zielonych organach roślin większość stanowi kwas cytrynowy. Jest on także jedynym kwasem znalezionym w kwiatach. W korzeniach natomiast na pierwszym miejscu znajduje się kwas jabłkowy. Dokładne ilościowe badania zawartości kwasów organicznych w różnych organach bobiku w czasie jego rozwoju są w toku.

Zakład Biochemii
Katedry Fizjologii Roślin
Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu
(Wpłynęło dn. 8.1.1961 r.)

SUMMARY

Organic acids in purified alcoholic extracts from horse bean tissues have been investigated by means of paper chromatography technique. Dry seeds and those being soaked during 24, 36 and 48 hours, then the seeds germinating in soil as well as leaves, stems, roots and flowers of plants cultivated in pot cultu..., were analysed. In all stages of growth as well as in all tissues, except for the flowers, citric, malic, and small quantities of succinic and fumaric acids have been found; in the green tissues, oxalic acid has also been detected. At least six different monocarboxylic acids, among them the quinic and shikimic ones, have been demonstrated in horse bean tissues by means of rechromatographic analysis. The uronic acids not yet identified are possibly present in the tissues in big quantities as well as some other acid oxidation products of sugars. The quantity of acids available in the dry seeds increases while soaking to diminish in the period of germination (3 to 6 days) and finally grow again, reaching its maximum in the leaves. In dry seeds as well as in the soaked ones and in green plant tissues, citric acid makes the greater part; it is also the only acid found in the flowers. In the roots, however, malic acid is predominant. Detailed quantitative investigations of organic acid content in different growing tissues of horse bean are continued.

LITERATURA

Aronoff S., 1956, Techniques of radiobiochemistry, ISCP, Ames, Iowa, 228 pp.

Bell D. J., 1955, Mono- and oligosaccharides and acidic monosaccharide derivates, w K. Paech, M. V. Tracey: Modern Methods of Plant Analysis, Springer Verl. Tom II.

Bentley L. C., 1952, Nature 170: 847.

Brown F., 1950, Biochem. J. 47: 598.

Brown F., Hall L. P., 1950, Nature 166: 66.

Coic Y., Lesaint C., 1960, C. r. Acad. Sci. 250: 914; Ann. Physiol. Vég. 2: 73.

Czesnokow W. A., 1954, Wiest. Leningr. Uniw. 9: 29.

Czesnokow W. A., Głagolewa T. A., Ljubimowa M. W., 1955, Ucz. zap. LGU Nr 186, Ser. biol. n. 39.

Dupéron R., 1958, C. r. Acad. Sci. 246: 298.
Jackson W. A., Coleman N. T., 1959, Soil Sci. 87: 311.
Krebs H. A., Smyth D. A., Evans A., 1940, Biochem. J. 34: 1041.
Kursanow A. L., 1954, Woprosy botaniki 1: 131.
Kursanow A. L., 1957, Izw. Akad. Nauk SSSR, Ser. biol. 689; Unesco Intern. Conf. Radioisotop. Sci. Res., Paris, NS/RIC/128.
Kursanov A. L., Kulajewa O. N., 1957, Fizjoł. rast. 4: 322.
Matthias W., 1954, Naturwiss. 41: 17.
Morrison R. I., Dekock P. C., 1959, Nature 184, Suppl. Nr 11: 819.
Ookubo N., 1957, Nihon Univ. Med. J. 16: 2192.
Reid R. L., Lederer M., 1951, Biochem. J. 50: 60.
Reifer I., 1955, Acta Biochim. Pol. 2: 367.
Schramm R. W., 1960, Chemia Anal. 5: 1055.
Schramm R. W., 1961, Acta Soc. Bot. Pol. 30: 285.
Sołdatienkow S. W., Mazurowa T. A., 1956a, Biochimia 21: 573.
Sołdatienkow S. W., Mazurowa T. A., 1956b, Biochimia 21: 652.
Sołdatienkow S. W., Mazurowa T. A., 1957, Biochimia 22: 345.
Sołdatienkow S. W., Mazurowa T. A., 1959, Fizjoł. rast. 6: 112.
Taylor T. G., 1953, Biochem J. 54: 48.
Virtanen A. I., Arhimo A. A., Sundman J., Jännes L., 1943, J. prakt. Chemie 162: 71.
Weil-Malherbe H., Bone A. D., 1949, Biochem. J. 45: 377.
Williams R. J., Kirby H., 1948, Science 107: 481.
Young R. H., Shannon L. M., 1959, Plant Physiol. 34: 149.

CHROŃMY PRZYRODĘ OJCZYSTĄ

DWUMIESIĘCZNIK

PODAJE WIADOMOŚCI O:

- PARKACH NARODOWYCH I REZERWATACH
- ROŚLINACH OCHRONNYCH
- ZWIERZĘTACH POŻYTECZNYCH I WYMIERAJĄCYCH
- POMNIKACH PRZYRODY TAKICH, JAK STARE DRZEWA OSOBLIWE SKAŁY, ŹRÓDŁA, GROTY itp.
- PIĘKNIE PRZYRODY RÓŻNYCH CZĘŚCI ŚWIATA

Cena zł 35.—

WARUNKI PRENUMERATY CZASOPISMA PT.

„ACTA SOCIETATIS BOTANICORUM POLONIAE"

kwartalnik

Cena w prenumeracie zł 140.— rocznie
zł 70.— półrocznie

Zamówienia i wpłaty przyjmują:

1. Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw „Ruch", Warszawa, ul. Srebrna 12, konto PKO Nr 1-6-100.020
2. Urzędy pocztowe i listonosze
3. Księgarnie „Domu Książki"

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę 40% drożej. Zamówienia dla zagranicy przyjmuje Przedsiębiorstwo Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych „Ruch", Warszawa, ul. Wilcza 46, konto PKO nr 1-6-100.024.

Bieżące numery można nabyć lub zamówić w księgarniach „Domu Książki" oraz w Ośrodku Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych Polskiej Akademii Nauk — Wzorcownia Wydawnictw Naukowych PAN—Ossolineum—PWN, Warszawa, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter).

TYLKO PRENUMERATA ZAPEWNIA
REGULARNE OTRZYMYWANIE CZASOPISMA